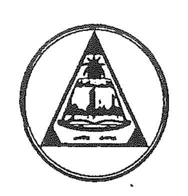
الجمهورية العراقية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة البصرة



الميكروبيولوجي الصناعي

الجزء الاول

أساسيات التخمرات الصناعية

تأليف
الدكتور عادل جورج ساجدي
استاذ مساعد
الدكتور علاء يحيى محمد علي
مدرس

قسم الصناعات الغذائية والألبان
كلية [illegible]عة — جامعة البصرة

تمهيـــد

يعد الميكروبيولوجي الصناعي حقـلا دراسـيا واسعا ومعقدا ، والمعلومات المتعلقة به كثيرة الا أن المعلن عنها قليل لكون قسم منها لا يزال سرا لا تفصح عنه المؤسسات المتخصصة في هذا المجال ٠

ويشمل الميكروبيولوجي الصناعي الاستخدامات العديدة للاحياء المجهرية في انتاج مواد ذات قيمة اقتصادية كبيرة جدا وكذلك استغلال المخلفات الناتجة عن المصانع والتجمعات السكانية في المدن ، فضلا عن الحيلولة دون تلف أغذية الانسان الطبيعية والمصنعة بواسطة الاحياء المجهرية غير المرغوبة ٠ وبدون تظافر علم الاحياء المجهرية والكيمياء بفروعها المختلفة والعلوم الهندسية وغيرها من العلوم الاخرى ، لا يمكن ايجاد حلول للمعضلات التي تعترض تقدم العاملين في مجال الميكروبيولوجي الصناعي ٠

وتتشابه الاسس التي تقوم عليها التخمرات الصناعية في انتاج مادة ما الا أنها تختلف في العمليات التفصيلية ٠

ولسنا نخفي أنه حينما راودتنا فكرة تأليف هذا الكتاب ، ليكون مرجعا شاملا للعمليات الميكروبيولوجية الصناعية الاساسية ، ان ترددنا في الامر طويلا ٠ الا اننا استعنا بالله العلي القدير وبالدعم اللامحدود الذي توليه القيادة السياسية للحزب والثورة لحركة تأليف وتعريب الكتب الجامعية في القطر وبدأنا أول الطريق وسرنا فيه غير مدخرين وسعا ولا ضانين بجهد حتى انتهينا منه ٠

ان الجزء الاول من هذا الكتاب بأبوابه الاربع يتضمن الكثير من الاساسيات والامور التفصيلية عن المواضيع الحيوية التي تهم الطالب والباحث والمشتغل في هذا المجال من كيمياويين وميكروبيولوجيين صناعيين وغيرهم ٠ وحاولنا جهدنا أن نجمع أكبر عدد من الابحاث والدراسات والمراجع الحديثة ذات العلاقة ونضعها أمام القارىء متناسقة ومترابطة وواضحة بالرسم والصور ٠

وقد لاقينا صعوبة في عـدم وجـود بعض المصطلحات المقـاربة للمصطلحات الاجنبية ، فما كان علينا الا تثبيت تلك المصطلحات بالنص كما وردت في معناها ولفظها الاجنبيين ٠

ونرجو أن نكون قد وفقنا في ملء الفراغ الواسع في المكتبة العربية التي تفتقر الى وجود كتب متخصصة من هذا النوع ٠

واننا اذ نقدم مجهودنا هذا ، نقدمه ونحن راضون عنه كل الرضا في غير تيه ولا خيلاء ، فكلنا أمام الخالق المعجز ضعفاء وأمام العلم صغار لم نشب عن الطوق ٠ كما نلتمس المعذرة عن اخطاء بغير قصد أو تصويب أو لم نصل بكتابنا الى الكمال ، ان الكمال لله وحده جل جلاله ٠

وفي الختام نود أن نقدم جزيل شكرنا وتقديرنا الى كل من أسهم في تقويم وطبع هذا الكتاب وابرازه الى حيز الوجود أملين أن نكون قد حققنا جزءا من الواجب الملقى على عاتقنا من أجل خدمة وطننا العزيز ٠

والله ولي التوفيق ٠٠٠

المؤلفـان

الدكتور عادل جورج ساجدي

الدكتور علاء يحيى محمد علي

المحتـــــويات

الباب الاول ـ مقـــدمة **الصفحـة**

الباب الثاني ـ الاسس التي تعتمد عليها عمليات التخمر الصناعي

الباب الثالث ـ العمليات الايضية للاحياء المجهرية

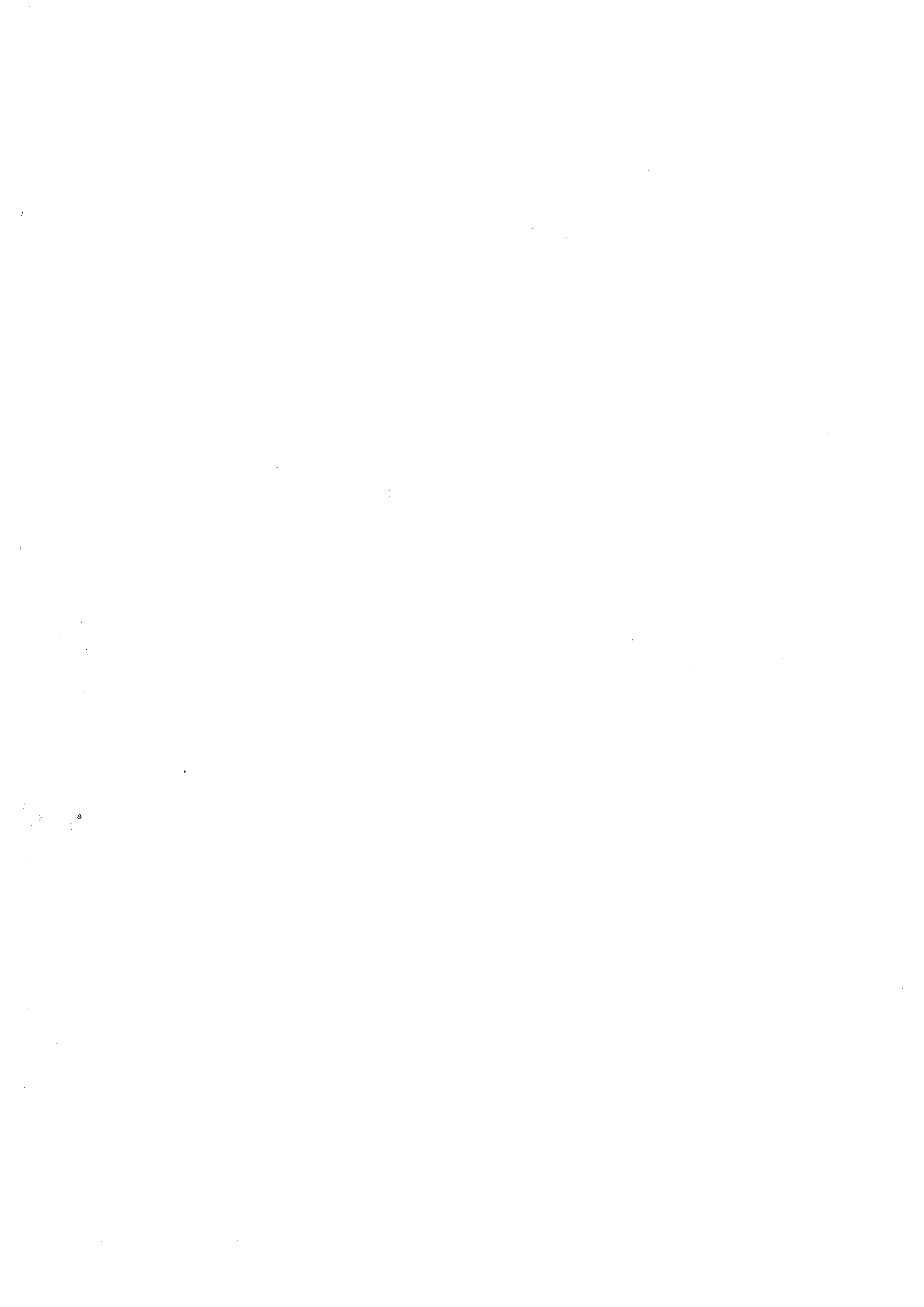
الصفحة

الباب الرابع ـ اتجاهات في الميكروبيولوجي الصناعي

PART 1 الباب الاول

مقدمة

INTRODUCTION



الفصل الأول

فكرة عامة عن التخمرات الصناعية

General Scope of Industrial Fermentations



ان الميكروبيولوجي الصناعي هو ذلك الجزء من علم الميكروبيولوجي الذي يبحث في الاستخدامات الممكنة للاحياء المجهرية في العمليات الصناعية ، أو في العمليات التي تصبح نشاطاتها ذات أهمية صناعية أو تقنية ٠

وفي معظم الاحوال يستخدم المقياس الاقتصادي عند الرغبة في اجراء أو منع نشاط أيضي معين ، وهذا دليل على ان الميكروبيولوجي الصناعي حقل واسع جدا للدراسة ٠ وفي الحقيقة ، يعد الكثير من الحقول غير الصناعية لعلم الميكروبيولوجي مهمة للمتخصص في الميكروبيولوجي الصناعي ، ويجب أن توضع في الاعتبار لفهم أفكار وتطبيقات الميكروبيولوجي الصناعي ٠ وتتضمن هذه الحقول ، ميكروبيولوجي التربة والزراعة ، والميكروبيولوجي الطبي ، وفسلجة الميكروبات ، وعلم السايتولوجي وعلم المورفولوجي ، وعلم الفيروسات ، والوراثة ، وميكروبيولوجي الاحياء البحرية ، وميكروبيولوجي الاغذية والالبان ، وعلم المناعة ٠ ان فروع المعرفة أو الدراسة التي لا تعد عادة من ضمن علم الاحياء المجهرية مثل الكيمياء العضوية واللاعضوية والفيزياوية ، والكيمياء الحيوية ، والهندسة ، والطب ، والاقتصاد ، والتسويق والقانون وخصوصا قانون براءات الاختراع أو الاكتشاف تعد فروعا ذات أهمية بالغة للمتخصصين في الاحياء المجهرية الصناعية ٠ بالاضافة الى ذلك فأن الحقول التي لا تعد حاليا ذات علاقة بالميكروبيولوجي الصناعي ، يمكن بسهولة أن تصبح تحت ظروف مناسبة مادة للدراسة ٠

وقد عرفت لعدة عقود أنواع عديدة من الخمائر والاعفان وفطريات واطئة اخرى وأنواع أو مجاميع عديدة من البكتريا بأن لها علاقة مباشرة سواء كانت مرغوبة أو غير مرغوبة مع بعض أنواع العمليات الاقتصادية الجارية المرتبطة بالعمليات الصناعية مثل صناعة البيرة ، وصناعة النبيذ ، وصناعة الجبن والخ ، التي نشأت من فنون ضيقة النطاق أو منزلية ٠ الا أن المعرفة في هذا الحقل توسعت في السنوات الاخيرة نتيجة للابحاث الجارية في العالم وفي مجالات متعددة ٠ وقد توسع نطاق العمليات وتركز في المصانع الكبيرة ، وبالتالي حلت الصناعة محل الفنون المنزلية ٠ وقد جعلت هذه التغيرات بصورة واضحة الميكروبيولوجي الصناعي ليس فقط فرعا من الدراسة متزايد الاهمية بل لقد أصبح فعلا فرعا مهما جدا للعلم التطبيقي وواحدا من أكبرها امكانية ٠

وعند مناقشة الميكروبيولوجي الصناعي ينبغي تأكيد فائدة المعرفة في هذا الحقل وأهميتها من زاويتين تطبيقيتين متضادتين تماما هما :

الزاوية الاولى والاكثر ايجابية ، هي معرفة الخصائص البايولوجية والكيمياحيوية لانواع عديدة من الاحياء المجهرية التي تعد المسببات الرئيسة والمباشرة لتحويل المواد كيمياويا الى النواتج المرغوبة • وبالتالي يمكن استخدام الاحياء المجهرية القادرة بواسطة عمليات تخمرية على انتاج كميات كبيرة نسبيا من المواد الكيمياوية ذات الفائدة والقيمة الاقتصادية • وفي هذا النوع من العمليات فأن الطرق الكيمو حيوية تعد في بعض الاحوال هي الطرق الملائمة الوحيدة للانتاج • والامثلة على ذلك انتاج بعض الاحماض العضوية كاللاكتيك والايتاكونيك والكوجيك والديكستران وبعض الفيتامينات وأغلب المضادات الحيوية •

ويكتسب الجزء الذي تقوم به الاحياء المجهرية في العمليات المركبة اهمية متساوية بالنسبة للميكروبيولوجيين ، حيث ان مردود ذلك هو أنتاج كميات صغيرة نسبيا من النواتج الثانوية المرغوبة التي يجب أن تتواجد كمواد ثانوية ولكنها مكونات مهمة في الناتج النهائي • والزاوية الثانية ، فقد لوحظ أن تخمرات الاحياء المجهرية قد لا تكون دائما مرغوبة بل قد تكون على العكس تماما • اذ يؤدي التلوث بأحياء غير مرغوبة الى تلف التخمرات الجارية بواسطة أحياء أخرى مرغوبة • وبالتالي مثلما يكون من الاهمية معرفة الاحياء المجهرية المفيدة لعملية ما ، كذلك ينبغي وجود معرفة للاحياء المجهرية التي قد تكون ضارة في عملية تصنيع ما وتسبب في خسارة اقتصادية •

ان المتخصص في الميكروبيولوجي الصناعي والمتدرب جيدا ينبغي أن تكون له القدرة على اكتشاف وتمييز نوع التلف الذي تسببه هذه الاحياء ، لكي يكون متمكنا وضليعا في طرق مقاومتها •

ويهتم علم الميكروبيولوجي الصناعي نفسه بعزل وتشخيص الاحياء المجهرية من البيئات الطبيعية كالتربة أو الماء ، وبالظروف المثلى للانتاج الصناعي المرغوب سواء في المختبر أو في الاوعية الكبيرة والتي تعرف بالمخمرات Fermentors .

ومن الواضح أن تصميم وتعقيم واستخدام هذه المخمرات يكون من الامور المهمة جدا ٠

وتعد وسائل الكشف والتقدير عن النواتج الكيمياوية للنشاط المايكروبي جزءا من الميكروبيولوجي الصناعي مثل الاسترجاع ، والتنقية الكيمياوية ، والتعبئة والتغليف ، والتسويق لمنتجات التخمر ٠ وبالتالي ، فأن مقدرة الاحياء المجهرية على تحويل المواد الاولية الرخيصة الى مواد عضوية ذات قيمة اقتصادية كبيرة تعدد من الامور التي يهتم بها علم الميكروبيولوجي الصناعي ٠ وتكتسب القيمة الاقتصادية للخلايا الميكروبية نفسها ، والانزيمات الداخلية والخارجية التي تفرز من قبل الاحياء المجهرية أهمية متزايدة ٠ حيث أن نشاطات هذه الانزيمات تكون مهمة في نجاح عملية التخمر الصناعي ، بسبب كونها مترافقة مع مقدرة الاحياء المجهرية على مهاجمة وتكسير واستهلاك مكونات البيئة لاعطاء نواتج التخمر ٠ وقد تفصل هذه الانزيمات لاستخدامها في عمليات صناعية أخرى ذات مردود اقتصادي كبير ٠

اذن نواتج التخمر قد تكون مكونات الخلايا الميكروبية أو الخلايا نفسها أو الانزيمات او المواد الكيمياوية الناتجة أو المتغيرة بواسطة الخلايا ٠ والجدول (1.1) يبين النواتج المختلفة للنشاط الميكروبي والمهمة تجاريا ٠ ولا يدرج هذا الجدول جميع النواتج ما دامت الاكتشافات من نواتج جديدة قائمة ٠

الجدول (1.1)

نواتج النشاط الميكروبي المهمة اقتصاديا

1- المضادات الحيوية : الستربتومايسين ، البنسلين ، التتراسيكلينات ، الاريثرومايسين ، البولي مكسين ، الباستراسين والخ ٠
2- المذيبات العضوية : الاستيون ، البيوتانول ، الايثانول ، الكحول الاميلي ٠٠ الخ
3- الغازات : ثاني أوكسيد الكربون والهيدروجين ٠
4- المشروبات : النبيذ ، البيرة ، المشروبات المقطرة ٠
5- الاغذية : الاجبان ، اللبن المخمر ، المخللات ، سوركراوت ، صلصة الصويا ، الخميرة ، الخبز ، الخل ، المشروم « عيش الغراب » ، السترويك ٠

6- مواد النكهة : جلوتامات الصوديوم الاحادية والنيوكليوتيدات •

7- الاحماض العضوية : اللاكتيك ، الخليك ، الستريك ، الجلوكونيك ، البيوتيريك ، الفيوماريك ، الايتاكونيك ، الكوجك • الخ •

8- الجليسرول •

9- الاحماض الامينية L —حامض الجلوتاميك L — لايسين •

10- الستيرويدات •

11- مدى واسع من المركبات المستخدمة كوسائط كيمياوية من أجل تخليقات كيمياوية أخرى لنواتج ذات قيمة اقتصادية •

12- خميرة الخباز •

13- الخمائر الغذائية والعلفية •

14- لقاح البقول Legume ionculant •

15- مبيدات الحشرات البكتيرية ، مثل **Bacillus thuringiensis**

16- الفيتامينات ومحفزات النمو الاخرى : B_{12} ، رايبوفلافين ، فيتامين **A** والجبريلينات •

17- الانزيمات : الاميليزات ، البروتييزات ، البكتينيزات ، الانفرتيز • الخ •

18- الدهون •

ولبراءات الاختراع أو الاكتشاف أهمية كبيرة للمختص في الميكروبيولوجي الصناعي اذ انها توفر درجة معينة من الحماية الاقتصادية للمكتشف « ومعاونيه » لعمليات تخمر أو لناتج جديد •

وفي هذا الكتاب سيعتبر الميكروبيولوجي الصناعي أساسا علما وفنا للاكتشاف والتحكم بالتخمرات التقنية وذلك باستخدام الاحياء المجهرية لانتاج نواتج نهائية مرغوبة لها استخدامات صناعية وتطبيقية ممكنة ومعروفة جيدا • ومن الجلي ، ان الظروف التي يحدث فيها فقد بواسطة التلوث أو الاصابة الميكروبية تؤثر في عمليات التصنيع لذا يجب أن تدخل ضمن هذه المادة • على الرغم من أن كل التفاصيل الدقيقة لصناعات معينة لا يمكن ذكرها في هذا الكتاب ، فقد حاولنا عرض المباديء والطرق العامة للتصنيع • ولمزيد من التفاصيل عن الموضوعات المختلفة الهامة ، يمكن للقاريء أن يرجع الى المصادر المدرجة في آخر كل باب من أبواب الكتاب •

الفصل الثاني

التطور التاريخي للتخمرات الصناعية

Historical Development of Industrial Fermentations

يعد علم الميكروبيولوجي الصناعي علما حديثا نسبيا كما هو الحال مع علم الاحياء المجهرية ، وقد يصل عمره الى 100 عام أو أكثر قليلا ، في حين يعود عمره كفن الى العصور القديمة • وفي وقتنا الحاضر لا يزال البعض من عمليات التخمر الصناعي يعد فنا أكثر من كونه علما • أن المفاهيم الاساسية للميكروبيولوجي الصناعي والمسحة الاكاديمية المرافقة لها يمكن تفهمها بصورة أفضل فيما لو أخذنا في الاعتبار بعض جوانبه التاريخية ، لان الاسلوب الصحيح والوحيد لاستقراء الحاضر والتنبؤ بالمستقبل هو مراجعة للسابق •

وقبل أن نتقدم في الكلام ، من الضروري جدا تعريف أصطلاح « التخمر Fermentation » خاصة وأنه سيستخدم بكثرة في هذا الفصل والفصول التالية • وقد اكتسبت هذه الكلمة مع مرور السنين معاني جديدة في حين تبقى محتفظة بالقديم • أساسا ، يشار الى التخمر بالفقاعات المتصاعدة عندما يتحول السكر والمواد النشوية لانتاج مشروبات كحولية • في حين يعد استخدام هذا الاصطلاح الى العملية التي يتكون فيها الكحول من السكر ، بصرف النظر عن كون العامل المسبب حياتي أم لا • وقد أشار باستور Pasteur الى أن اصطلاح التخمر يستخدم للدلالة على تلك التفاعلات اللاهوائية التي تحصل الاحياء المجهرية خلالها على الطاقة اللازمة لنموها في غياب الاوكسجين • واليوم ، فأن للتخمر معنى اوسع من ذلك بكثير ، فهو يستخدم لكلا نشاطات الاحياء المجهرية الهوائية واللاهوائية التي فيها تحدث تغيرات كيميائية معينة في المادة العضوية • وفي الحقيقة ، ومن وجهة نظر المايكروبيولوجي الصناعي لا يزال المعنى أوسع من ذلك ، اذ يتضمن تقريبا اي عملية تتوسطها أو تشترك فيها الاحياء المجهرية التي فيها يتراكم الناتج ذو القيمة الاقتصادية •

ومن الممكن تقسيم تاريخ التخمرات الصناعية « المايكروبيولوجي الصناعي » الى فترتين اساسيتين تتخللهما فترات متعددة •

الفترة الاساسية الاولى تبدأ من العصور القديمة وحتى عام 1860 ، أي فترة ما قبل باستور • خلال هذه الحقبة الزمنية الطويلة وقبل اكتشاف المجهر من قبل الهولندي انتوني فان ليفنهوك Antony Van Leewenhock في القرن السابع

عشر ، كانت التخمرات الصناعية معروفة على أنها فن وليس علما • اذ أن بعض العمليات التخمرية المتضمنة اشتراك الاحياء المجهرية كانت تجري وبصورة تكرارية اذا اتبعت الطرق والخطوات السليمة للتخمر • وكانت خبرة الانسان في مثل هذه التخمرات تعود الى العصور القديمة رغم افتقاره للمعلومات العلمية الاساسية عن كيفية حدوث التخمر • فالتخمر الكحولي كان معروفا منذ القدم ، والتخمر الهوائي للفطر **Aspergillus oryzae** كان معروفا أيضا ، وخميرة الخباز كانت تصنع « لاهوائيا » ومن ثم تباع • وكان مولد الخل تحت الاستخدام العام • وبعض الطرق مثل البسترة ، والتقليح وما يسمى بشبه التطهير كانت تمارس دون معرفة كنه هذه الطرق • كما لوحظ أن الهواء يعد ضروريا لبعض التخمرات • ومما يجدر مناقشته انه لا يمكن أن تعرف حقيقة التخمر ما دامت طبيعة العوامل المسببة للتخمر غير معروفة • وهذا يعد برهانا جيدا ، ولكن يجب أن نضع نصب أعيننا بأن كثيرا من الاعمال التي نؤديها الان لا تزال تؤدي بدون معرفة سبب ادائها وكيفية اجرائها •

وفي القرن السابع عشر كان انتوني فان ليفنهوك **Antony Van Leewenhock** اول من ذكر عن مشاهداته لكائنات صغيرة الحجم لا ترى بالعين المجردة ولا بد من استخدام وسائل تكبير لرؤيتها وجاء ذلك في رسائله الى الجمعية الملكية في لندن خلال اعوام 1677-1684. •

أما الفترة الاساسية الثانية فتبدأ من عام 1860 ، أي بعد اكتشافات باستور ، حيث كانت بداية علم الاحياء المجهرية • وكان التقرير الاول لباستور يدور حول تخمر حامض اللاكتيك وليس التخمر الكحولي ، حيث ذكر بأن هذا التخمر تسببه كائنات حية مجهرية كما قام بوصف مظهرها الميكروسكوبي • وكذلك استطاع باستور فصل البكتريا من بيئة التخمر بواسطة غسل الخلايا ، ولكنه لم يكن قادرا على الحصول على الخلايا في مزرعة نقية ، لانه في ذلك الوقت لم تكن تعرف بعد المزارع النقية للاحياء المجهرية • واستطاع باستور تنمية الخميرة في بيئة مخلقة وبرهن على أن تخمر السكر يلزمه تزايد في عدد خلايا الخميرة ، وبعبارة أخرى فأن نظرية التوالد الذاتي لا تفسر وجود التخمر في هذه البيئة • وقد ذكر باستور في أحد تقاريره عام 1861 أن سبب وجود عدد من المركبات

في تخمر حامض اللاكتيك قد يعود الى وجود عدد من الكائنات المهمة في وسط النمو ٠

وقد دحض باستور عام 1861 نظرية التوالد الذاتي Spontaneous Generation عند أوضح ما يسمى بتأثير باستور "Pasteur effect" وهي الظاهرة التي فيها يختلف نمو وفسيولوجية الخميرة ، أو أي كائن حي مجهري ، سواء كانت نامية تحت ظروف هوائية أو لا هوائية ٠ اذ لاحظ باستور أنه في الظروف اللاهوائية حدث نمو قليل نسبيا وأن كمية كبيرة من السكر تحولت الى كحول ، وقال أن سبب ذلك يعود الى أن الخميرة تحصل على الاوكسجين اللازم لها من جزئية السكر ٠ وتحت الظروف الهوائية فأن السكر يكون أقل تهدما في حين يتحول الجزء الاعظم منه الى مواد خلوية ٠ وأن وجود الهواء يؤدي الى تكوين كمية قليلة من الكحول لان الهواء يثبط التكسير التخمري للسكر ٠ وفيما بعد أوضح باستور بأن التخمرات المتميزة بتكوين منتجات معينة ، مثل حامض الخليك ، والكحول ، وحامض البيوتيريك ، وحامض اللاكتيك ، تعتمد على أنواع مختلفة من الاحياء المجهرية وأن التلوث بالميكروبات غير المرغوبة تسبب في تخمرات رديئة ٠ وقد أثبت ليستر Lister عام 1878 أول طريقة للحصول على مزارع نقية من الاحياء المجهرية وذلك باستخدام طريقة التخفيف المتتالي لتقليل فرصة تواجد الاحياء المجهرية الملوثة ومن ثم استخدام طريقة العد الميكروسكوبي لتحديد مدى التخفيف اللازم لاختفاء الملوثات ولتحديد مقدار التخفيف الذي يمكن أن يبقى عنده الكائن الحي الرئيس مشاهدا في التحضيرات الميكروسكوبية ، ومن ثم فصل الكائن الحي المجهري في مزرعة نقية ٠ وفي يومنا هذا ، تعد هذه الطريقة الاساس في تقدير اعداد الاحياء المجهرية بواسطة طريقة العد الاحتمالي ، ولا تزال في بعض الاحيان مستخدمة لعزل الاحياء المجهرية ٠ وفي عام 1897 اثبت أخوان بخنر وهان Buchner brothers & Hahn بأن السكريات يمكنها أن تتخمر بغياب خلايا الخميرة بواسطة مستخلص الخلايا الذي يحتوي على مواد تقوم بعملية التحويل هذه ٠ وقد كان هذا الاكتشاف الولادة الفعلية لعلم الكيمياء الحيوية بعد نصف قرن من الابحاث حول طبيعة التفاعلات الكيموحيوية ٠

وتم بين عام 1860 و 1900 اخضاع تخمر آخر ، حامض اللاكتيك ، الى الممارسة الصناعية • كما تطورت طريقة اضافية أخرى وهي استعمال التهوية في سوائل المخمرات ، اذ لاحظ العاملون ان الخميرة تنمو بصورة أفضل عند تهوية البيئة •

وخلال العشرين سنة التالية أي من 1900 الى 1920 كان هناك نشاط أكبر عائد بصورة جزئية على الاقل الى الحرب العالمية الاولى • فقد تم انتاج تخمري للجليسرول ، والاستيون والبيوتانول وكذلك للانزيمات البكترية والفطرية • وتم عمل حوض ايمهوف Imhoff tank للهضم اللاهوائي لمياه المجاري ، وكذلك اكتشفت عملية الوحل المنشط لمعاملة مياه المجاري هوائيا • وخلال هذه الفترة اكتشفت طريقة الانتاج الهوائي للخميرة بواسطة الاضافة المستمرة للسكر التي يعتقد أنها فترة ولادة الصناعة التخمرية •

خلال العشرين سنة التالية ، من 1920 الى 1940 عرف عدد قليل من التخمرات واكتشف عدد قليل من الطرق • ومن التخمرات الرئيسة الجديدة هي انتاج السوربوز Sorbose وانتاج حامض الجلوكونيك • وبطبيعة الحال كانت هناك تحسينات عديدة للتخمرات القديمة • كما تم اكتشاف طريقتين جديدتين مهمتين وهما استخدام المخمر المهتز والمهوى Agitated and aerated fermentor وتعقيم الهواء بواسطة المرشحات الليفية • ويبدو أن صناعة التخمير قد وصلت الى مرحلة الاستقرار بحيث لا تستطيع ان تنمو بصورة اسرع من اقتصادياتها •

بعد ذلك من عام 1940 الى 1950 أنفجرت الصناعة التخمرية ، ويعزى ذلك الى اكتشاف البنسلين ، الذي شجع على اكتشاف مضادات حيوية أخرى ، محدثا قفزة نوعية في العلاج الطبي • فقد اكتشف الكسندر فلمنج Alexander Fleming عام 1928 البنسلين من الفطريات ولكن لم يستخدم في العلاج الا أثناء الحرب العالمية الثانية عام (1941) •

هذا الاكتشاف شجع باحثين آخرين للبحث عن أحياء مجهرية أخرى يمكنها تخليق مضادات حيوية أخرى • ونتيجة للبحث المكثف خلال الحرب العالمية الثانية وبعدها تم اكتشاف الستربتومايسين ، والكلورو امفنيكول والتراسيكلينات

وسلسلة من المضادات الحيوية ذات الاهمية الاقتصادية والطبية الكبيرة ٠

لم يكن هذا الوضع بمثل هذه البساطة ، فهل كان الانتاج التخمري للرايبوفلافين وفيتامين B_{12} الذي تطور خلال نفس الفترة هو نتيجة اكتشاف البنسلين ؟

يشك معظم الباحثين في ذلك ، ويعتقدون ان السبب يكمن في الاتي :-

(1) ادخال الاوعية المهواة والمرجوجة كمخمرات هوائية ٠

(2) تعقيم الهواء بامراره خلال المرشحات الليفية ٠

(3) اكتشاف طريقة الدورق المرجوج Shake flask كوسيلة مختبرية هوائية ، مكنت الباحثين من استغلال المشاهدات التي لم يسبق استغلالها ٠ هذه المشاهدة تكمن في أن بعض الاحياء المجهرية عندما تنمو هوائيا تكون كميات كبيرة من الرايبوفلافين يمكن استغلالها بسهولة اذا توفرت الدوارق المرجوجة للعمل المختبري وتوفرت مخمرات جيدة لعملية الانتاج ٠

وخلال الفترة من عام 1950 الى 1960 تطورت تخمرات جديدة من ضمنها انتاج الاحماض الامينية ، والستيرويدات ، وبعض المضادات الحيوية الجديدة والجبرلينات ٠

وتعد طريقة استخدام طفرات معوقة أيضيا Metabolically blocked mutants من الطرق الحديثة نسبيا ولكنها ذات أهمية بالغة جدا ، حيث ساهمت دراسة هذه الاحياء في زيادة معرفتنا لوراثة الاحياء المجهرية ، كما وفرت وسائل لتوجيه الاحياء المجهرية نحو تكوين كميات كبيرة من المواد الايضية الوسطية التي عادة ، وبسبب تواجدها الانتقالي في المسارات الايضية ، لا تتراكم لاي مدى في المزارع الميكروبية الاعتيادية ٠

ومنذ عام 1960 لم يحدث أي تطور هام في التخمرات الجديدة ما عدا انتاج النيوكليوتيدات لاستخدامها مواد منكهة في الاغذية ٠

واذا حاولنا التفكير في الطرق الجديدة المكتشفة منذ عام 1950 ، يمكن أن نستخلص أن التقدم الرئيس حصل في أجهزة القياس والتحكم بالتخمرات ، أي

قياس ال pH والتحكم به والسيطرة على الرغوة وايجاد طرق للتحليل الكيمياوي الالي والتحليل الكروماتوجرافي للغازات الناتجة وما شابه ذلك ٠

ومنذ عام 1950 نلاحظ أن هناك تباطؤا في معدل اكتشاف طرق وتخمرات جديدة ٠ واذا استطعنا استقراء الميول الحالية ، ينبغي أن نخلص الى القول من أن الصناعة التخمرية ستبقى متواجدة ، ولكنها ستصل الى وضع معين مشابه لظروفها خلال الحقبة السابقة أي خلال ال 5000 سنة الماضية ٠

من هذا السياق التاريخي المختصر ، يبدو لنا أن عددا من الباحثين الاوائل لم يعمل لحل المشكلة او لتفسير نتائجهم في صورة تطبيقات في الميكروبيولوجي الصناعي بحد ذاته ٠ ولكن من الواضح أن العديد من هذه الدراسات قدم الكثير للتقنية وللميكروبيولوجي الصناعي الحديث بالاضافة الى التقنية التي كانت موجودة في أزمنة أجراء هذه الابحاث ، كما نشاهد ان العديد من الطرق والمفاهيم التي تم تطويرها لا تزال صالحة ليومنا هذا ٠

الفصل الثالث

أجهزة ومعدات التخمر

Fermentation Apparatus and Equipments

1. المقومات الاساسية لوحدة التخمير
2. حجم المخمرات
3. تصميم المخمر
   - 3-1 المخمرات المستخدمة في التخمرات الهوائية .
   - 3-2 المخمرات المستخدمة في التخمرات اللاهوائية .

1.٥ الخواص الاساسية لوحدة التخمير ·

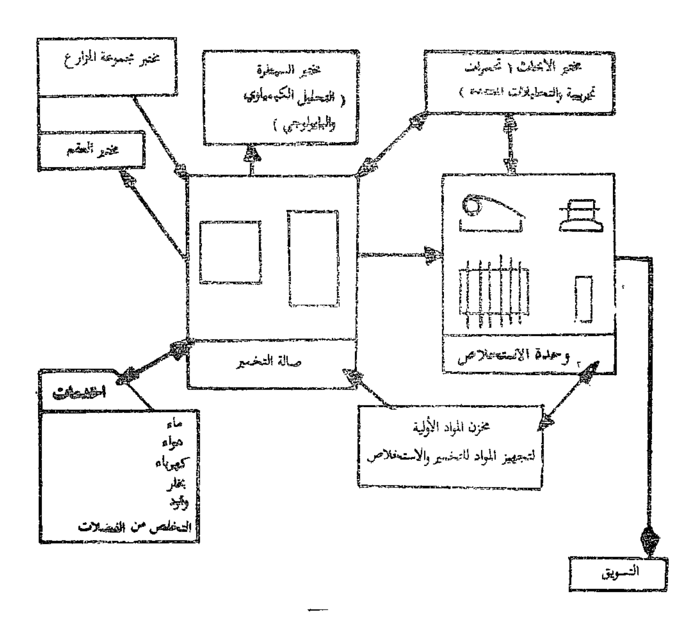
Essential Features of a Fermentation Unit

غالبا ما يتطلب استخدام الاحياء المجهرية صناعيا تنميتها في أوعية كبيرة تحتوي على كميات مناسبة من الاوساط الغذائية · وعادة تدعى هذه الاوعية بالمخمرات Fermentors والتي قد تكون بالغة التعقيد في تصميمها ، ومجهزة دائما بوسائل التحكم ومراقبة الاوجه المتعددة لنمو الاحياء المجهرية ونواتج تخليقاتها الحيوية ·

وقبل دراسة التطورات التفصيلية لعملية التخمر أو ميكانيكيتها ، ينبغي التعرف على تصميم وعمل المخمرات والمعدات المساعدة والملحقة بها وكذلك التحديدات التي تفرضها هذه المخمرات على الطرق التي يمكن بواسطتها حصاد الاحياء المجهرية على النطاق الصناعي ·

ان وحدة التخمير في التخمرات الصناعية تكون مشابهة للمصنع الكيمياوي في الصناعة الكيمياوية · ويعود وجود الاختلافات الى احتياجات العملية الحياتية للتعقيم ولضمان سير تفاعلاتها الانزيمية مقارنة بالتفاعلات الكيمياوية وعواملها المساعدة والتي تجري أحيانا عند درجات حرارة وضغط مرتفعين ·

وبصورة عامة تكون اساسيات التصميم قابلة للتطبيق بصرف النظر عن حجم العملية التخمرية · والوصف الذي سنذكره في هذا الفصل يتعلق بوحدة تخمير مناسبة لوحدة تجريبية صغيرة النطاق ، أو بمصنع صغير يوفر كميات تجريبية من المواد الايضية ، أو بمصنع انتاجي كبير ، والشكل 1.3 يوضح رسما تخطيطيا عاما لوحدة تخمير ·



الشكل ( ) رسم تخطيطي لوحدة تخمير

وقد صممت المخمرات الصناعية لتهيء أفضل ظروف نمو وتخليق للمزارع الميكروبية المهمة صناعيا ، ولتسمح بالمعالجة السهلة لجميع العمليات المصاحبة لاستخدام المخمرات "

ومن أهم الشروط الواجب توفرها أو مراعاتها في المخمرات الصناعية هي :-

أ- يجب أن تكون أوعية التخمير قوية متينة لكي تتحمل ضغوط الأحجام الكبيرة من البيئة السائلة ، إضافة إلى كونها مصنوعة من مواد مقاومة للتآكل وفعل نواتج التخمر ولا تسمح بأية أبخرة سامة لوسط أو بيئة النمو .

ب- نظرا لكون معظم التخمرات الصناعية تستخدم مزارع ميكروبية نقية ، يجب أن يكون للمخمرات بعض الاحتياط أو الاستعداد المسبق للتحكم في نمو الأحياء المجهرية الملوثة أو منعها .

3. في التخمرات الهوائية ، يجب أن يكون هناك احتياط أو استعداد مسبق للادخال السريع لهواء معقم الى البيئة بطريقة ما بحيث يذوب اوكسجين هذا الهواء في البيئة ، وبالتالي يكون متاحا بسهولة للاحياء المجهرية وكذلك يصبح ثاني اوكسيد الكربون الناتج من العمليات الايضية لهذه الاحياء microbial metabolism سهل الابعاد من البيئة ◦

4. يجب أن يتوفر في هذه المخمرات نوع معين من التقليب أو التحريك ، خصوصا عند انعدام تكون فقاعات غازية خلال النمو الميكروبي ، لمزج الاحياء المجهرية في البيئة وجعل المواد المغذية والاوكسجين أكثر تيسرا للكائن الحي المجهري بحد ذاته ◦

5. يجب أن يوفر المخمر اضافة متقطعة من المواد المانعة للرغوة antifoam agents كلما دعت حاجة البيئة الى ذلك ◦

6. يجب توفر نوع معين من التحكم الحراري وذلك للحفاظ على درجة حرارة ثابتة ومقدرة سلفا في المخمر أثناء نمو الكائن الحي المجهري ◦

7. يجب أن يوفر المخمر وسائل مطهرة لادخال اللقاح في بداية العملية ولسحب عينات مزرعية خلال عملية التخمر ◦

8. غالبا ما يحتاج المخمر الى ميكانيكية معينة للكشف عن قيم pH بيئة النمو ولتثبيتها خلال عملية النمو ، حتى ولو كانت هذه تتضمن سحب عينة من المخمر لتقدير الـ pH تتبعه اضافة القلوي أو الحامض الى بيئة التخمر ◦

9. وبالاضافة الى المخمر ، يجب توفر احواض لقاح أضافية ، وهي في الواقع مخمرات أصغر حجما ينتج فيها اللقاح الذي سيضاف مباشرة الى المخمر بدون استخدام انابيب كثيرة وذلك لتلافي مشاكل التلوث التي قد ترافق استخدام مثل هذه الانابيب ◦

10. قد يستدعي الامر وجود أوعية أخرى لمزج مكونات البيئة والماء عند تحضير الوجبات الكبيرة من البيئة لاضافتها الى مخمرات الانتاج ◦

11 . يجب توفر وسائل معينة لتعقيم بيئة الانتاج وكذلك المواد المانعة للرغوة ◦

12 . وفي العديد من المخمرات ، يجب توفر مرشحات هوائية أو وسائل تعقيم معينة بين مصدر ضغط الهواء العالي وبين مكان دخوله الى المخمر ◦

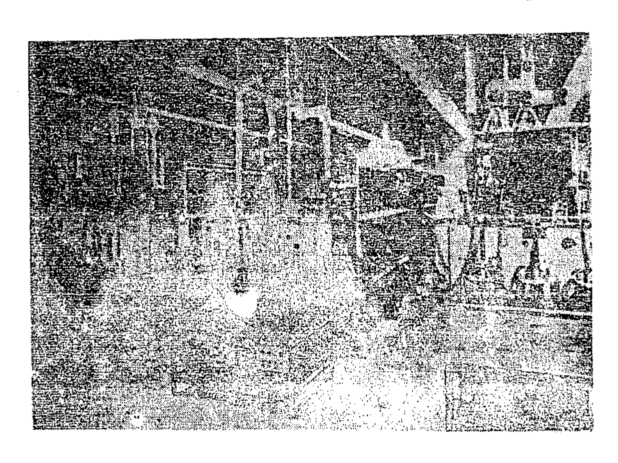
13 . يجب أن تكون هناك فتحة تصريف في قاع المخمر أو ميكانيكية معينة لازالة البيئة السائلة من الحوض بعد انتهاء التخمر وذلك لغرض التنظيف الجيد بين وجبات التخمر المتعاقبة ٠

2. حجم المخمرات Size of Fermentors

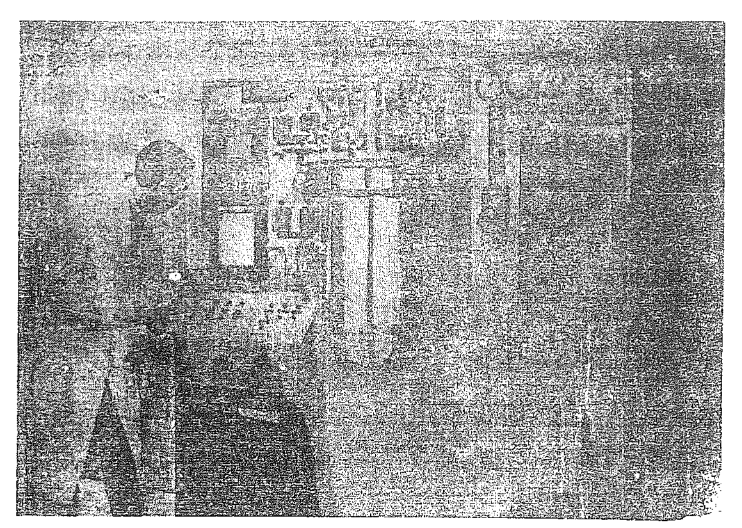
توجد المخمرات بأحجام متفاوتة ، وعادة تحسب هذه الاحجام على أساس السعة الحجمية الكلية للمخمر ٠ بينما يكون حجم التشغيل الفعلي للمخمر اقـل من الحجم الكلي ، وذلك بسبب الفراغ الرأسي Head Space الذي يجب تركه في قمة المخمر أي أعلى البيئة السائلة لاجل السماح لـرش Splashing وارغـاء foaming وتهوية السائل ٠ ويحتـل الفراغ الرأسي حجما يعادل حوالي خمس الى ربع حجم المخمر او اكثر ٠

والمخمرات المختبرية الصغيرة كما هي مبينة في الشكل (2.3) لها حجم كلي يتراوح بين 1-2 لتر من البيئة وبحد أقصى قدره 12-15 لترا تقريبـا (الشكل 3.3)٠

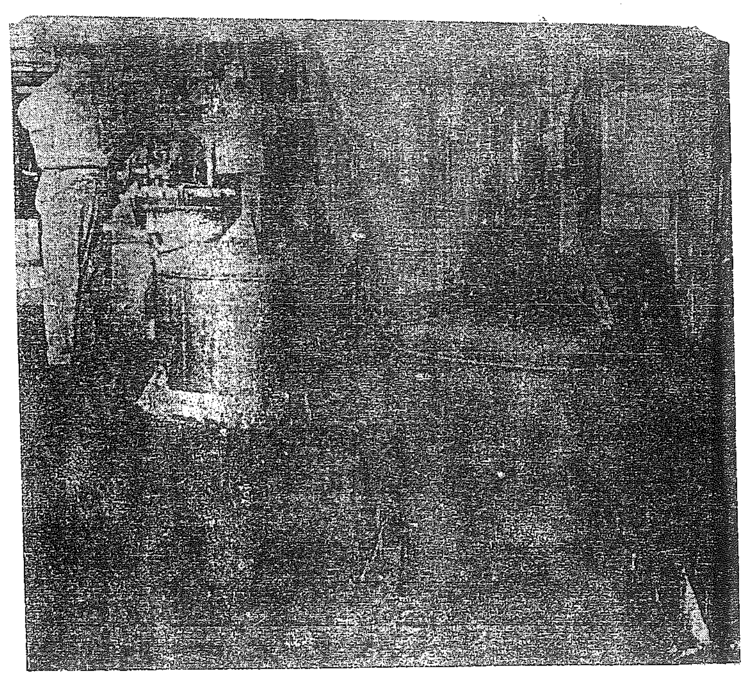
أما مخمرات المصانع والتي تستخدم في دراسات تخمرية ذات نطاق أوسع ، فغالبا ما يتراوح حجمها بين 1-4 هكتولتر ولغاية حجم كلي قدره 75 هكتولتر ، كما مبين في الشكل (4.3) ٠



الشكل (2.3) مخمرات مختبرية صغيرة
للدراسات البحثية وتطوير تخمرات جديدة ؟

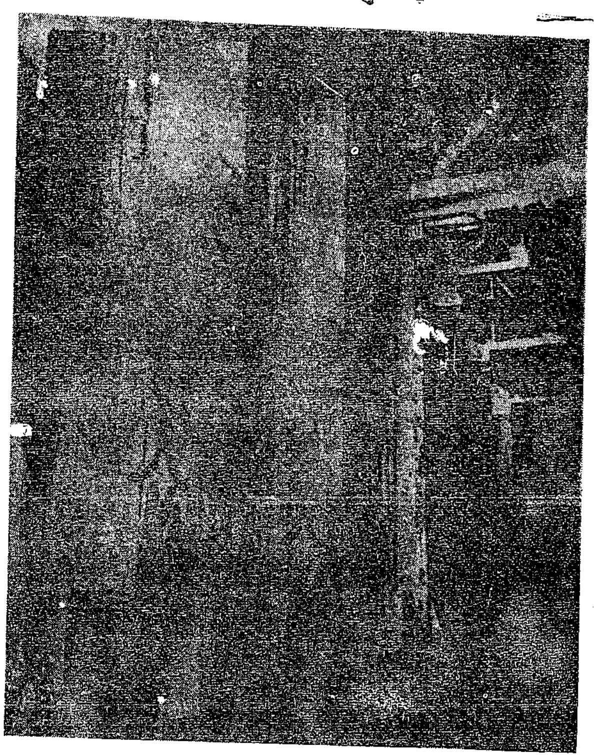


الشكل (3.3) مخمر صغير للدراسات البحثية



في دراسات اختبار المخمرات الجديدة

بينما المخمرات الكبيرة والمستخدمة في الانتاج الصناعي لنواتج التخمير أو الخلايا الميكروبية فأن حجمها يتراوح بين 200-400 مكتولتر والى حوالي 4000 مكتولتر ، كما هو مبين في الاشكال (5.3) و (6.3) و (7.3) •



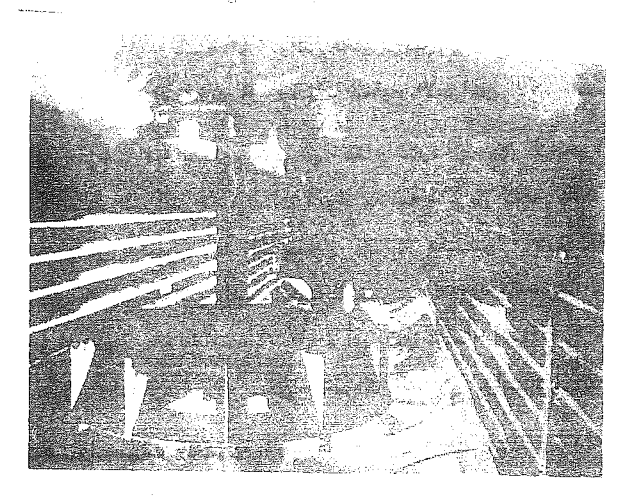
الشكل (5.3) مخمرات الانتاج الصناعي الكبيرة

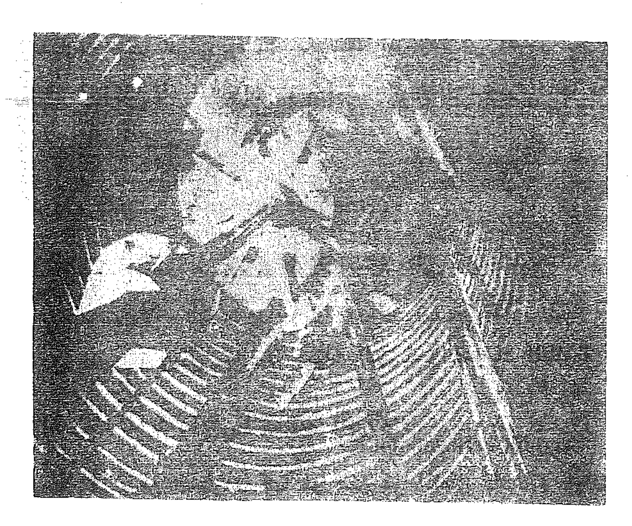
ونادرا ما تستخدم مخمرات ذات احجام اكبر من الاحجام المذكورة سابقا وتكون كروية الشكل وبسعة كلية تتراوح بين 10,000 الى 20,000 مكتولتر •

وبالنسبة الى المخمرات المختبرية الصغيرة الحجم فانها تستخدم في مجاميع مؤلفة من اثنين او ثلاث او أكثر من المخمرات بحيث تسمح بمرونة عالية في ابحاث تطوير عمليات التخمر • وبالتالي فأن عددا من المتغيرات التجريبية وبتحكم دقيق يمكن اختباره وامضا بعد الاخر في مثل هذه المخمرات الصغيرة • وبالاضافة

الشكل (3.6) منظر داخلي لمخمر انتاجي كبير

« التصميم الاعتيادي »





الشكل (3.7) منظر داخلي لمخمر انتاجي كبير

« تصميم غير اعتيادي »

الى ذلك فأن ظروف التخمر المثلى المقدرة بهذه المخمرات غالبا ما تكون قابلة للتطبيق في التخمرات الكبرى وباستخدام احواض تخمير اكبر • وقد تستخدم المخمـــرات الصغيرة في تحضير اللقاحات أو البادئات لتقليح الاحواض الاكبر حجما •

واذا افترضنا انه يستلزم حجم من اللقاح قدره 1-5% لاغلب التخمرات ، لذا ينبغي اختيار أحواض تخمير ذات أحجام ملائمة لتكوين كمية كافية من اللقاح لتلقيح الاحواض الكبيرة جدا ذات سعة 4,000 هكتولتر • ومع ذلك يجب أن نتذكر بأن هناك اختلافا بين السعة الكلية للمخمر Total Fermentor Capacity وبين حجم التشغيل Working volume « أي الذي تشغله البيئة فعلا » • ويوضح الشكل (8.3) والشكل (9.3) بعض المخمرات المختبرية وأحجامها التشغيلية •

وتكون المخمرات المختبرية الصغيرة مصممة بحيث تمتلك مرونة كبيرة في توفير ظروف مختلفة لنمو الاحياء المجهرية • وبنفس الوقت ، فأنه يمكن تثبيتها لتوفير ظروف نمـــو ميكروبية مشابهة لتلك الموجودة في أكبـــر أحواض التخمير الصناعية • وهكذا فأن المخمرات سواء كانت كبيرة أو صغيرة فأنها تكون متشابهة نوعا ما من ناحية تصميمها الميكانيكي •

3 . تصميم المخمـــر Fermentor Design

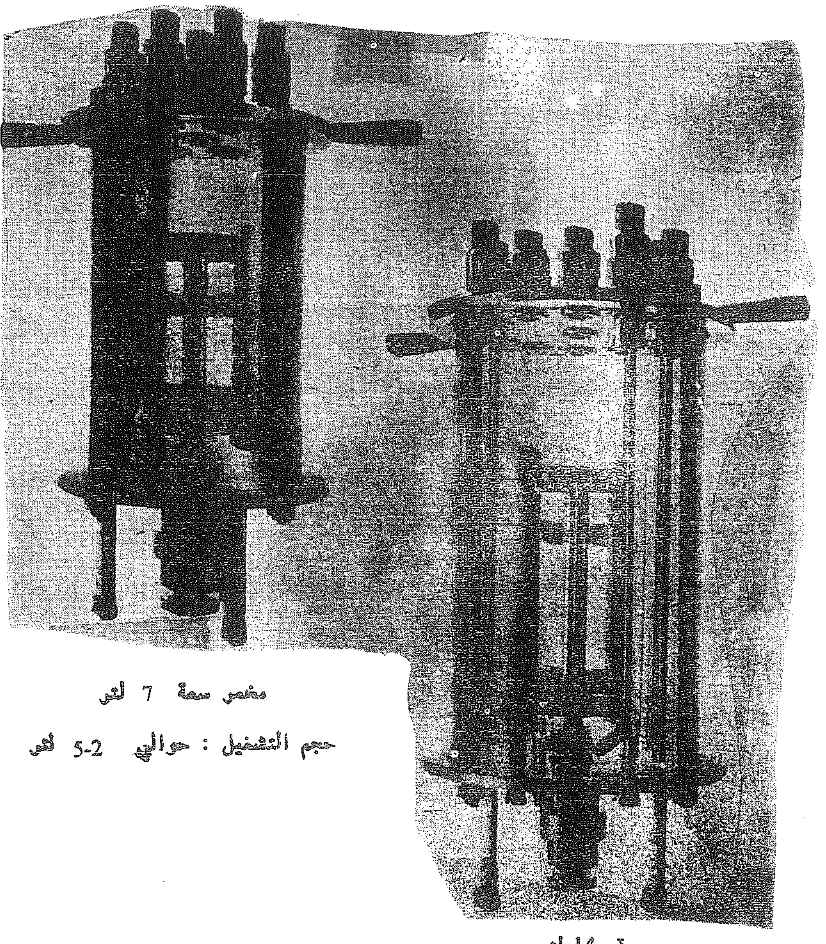
ان وظيفة المخمر هي تجهيز ظروف بيئية مثلى لكل عملية بايولوجية معينة • وهناك نوعان من المخمرات : هوائية ولا هوائية ، ويتم تقدير وتحديد الاختلافات في تصميم هذين النوعين بواسطة كميات التهوية والتحريك المطلوبة •

1.3 المخمرات المستخدمة في التخمرات الهوائية :
Fermentors for aerobic Fermentations

هذا النوع من المخمرات كما هو مبين في الشكل (10.3) عبارة عن وعـــاء مغلق يمكن تعقيمه وتهويته وتحريكه كما يتم التحكم بدرجة حرارة محتوياته بدقة عالية جدا •

وعادة يكون شكل المخمر اسطوانيا ذا قاعدة مستديرة ومدخل يضمن سهولة عملية التنظيف وبارتفاع يتفاوت بين 50-100% اكبر من قطره • ويتحرك محور ادارة المحرك خلال مركز المخمر ويحمل دوارا أو أكثر حسب طول المخمر وشدة

التحريك المطلوبة . ويصمم محور التحريك والمحرك بسعة 0.25 قوة حصانية لكل هكتولتر واحد من بيئة التخمر .



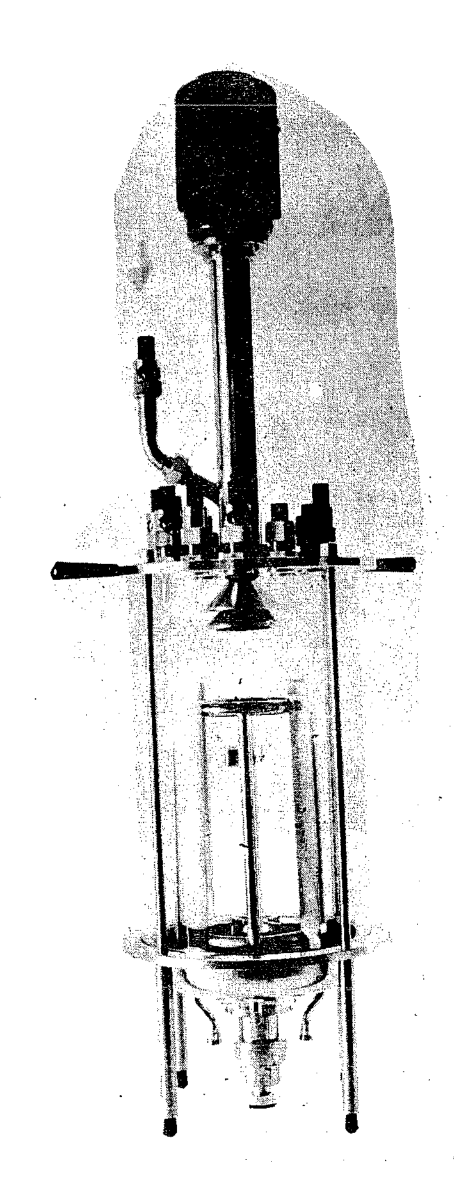
مخمر سعة 7 لتر

حجم التشغيل : حوالي 2-5 لتر

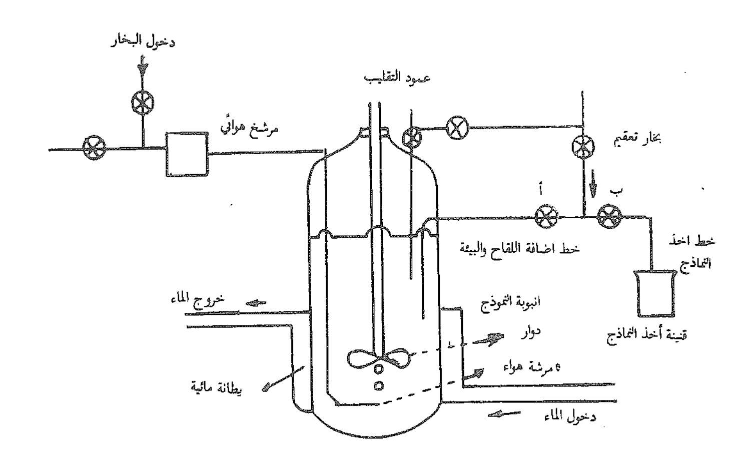
مخمر سعة 14 لتر

حجم التشغيل : 5-10 لتر تقريبا

الشكل (8.3) . مخمرات مختبرية حديثة ذات أحجام تشغيل مختلفة



الشكل (9.3) · مخمر مختبري حديث سعة 20 لترا وحجم تشغيل 15-8 لترا تقريبا ·



الشكل (10.3) تصميم المخمر

في حين يصمم نظام التبريد لازالة كل من الحرارة المتولدة نتيجة للتحريك والحرارة المتولدة من العمليات الايضية للمزرعة الميكروبية ، والمحافظة على درجة حرارة مثلى في سائل التخمير التي تعتمد على نوع الاحيـاء المجهرية المستخدمة والغرض من استخدامها لاعطاء منتوج التخمر المرغوب • ويمر هواء معقم بواسطة الترشيح خلال صمام ذو اتجاه واحد بمعدل أقصى مكافيء لحجم واحد من البيئة في الدقيقة الواحدة • ويدخل الهواء الى سائل التخميـر بواسـطة مرشة هـواء air sparger موجودة في قاع المخمر حيث يكون موقعها تحت أوطأ دوار تماما • أن تصميم مرشة الهواء يجمع بين وجود فتحات رش ليست واسعة جدا بحيث تقلل من معدل سريان الهواء ولا صغيرة جدا بحيث تؤدي الى انسداد منافذ الهواء بواسطة دقائق البيئة • وأخيرا ينفث الهواء الى الجو الخارجي خلال انبوب طويل يتم تعقيمه دوريا • ويتم تقليل تلوث المخمرات الاخرى بواسطة الهواء المستهلك والمستنفذ الى الحد الادنى وذلك بنفثه باتجاه الريح •

في بعض العمليات الصناعية يتضمن أنبوب الهواء المنفوث مرشحا بكتيريا وذلك لمنع انتقال الاحياء المجهرية من المخمر الى الهواء ٠

وقد تحدث رغاوي في بيئة التخمر السائلة وعلى فترات ، لذلك يتمكن القائم بالتشغيل من التحكم بها بأضافة زيوت مانعة الرغاوي بحيث لا يحصل فقد في سائل البيئة بسببها ٠

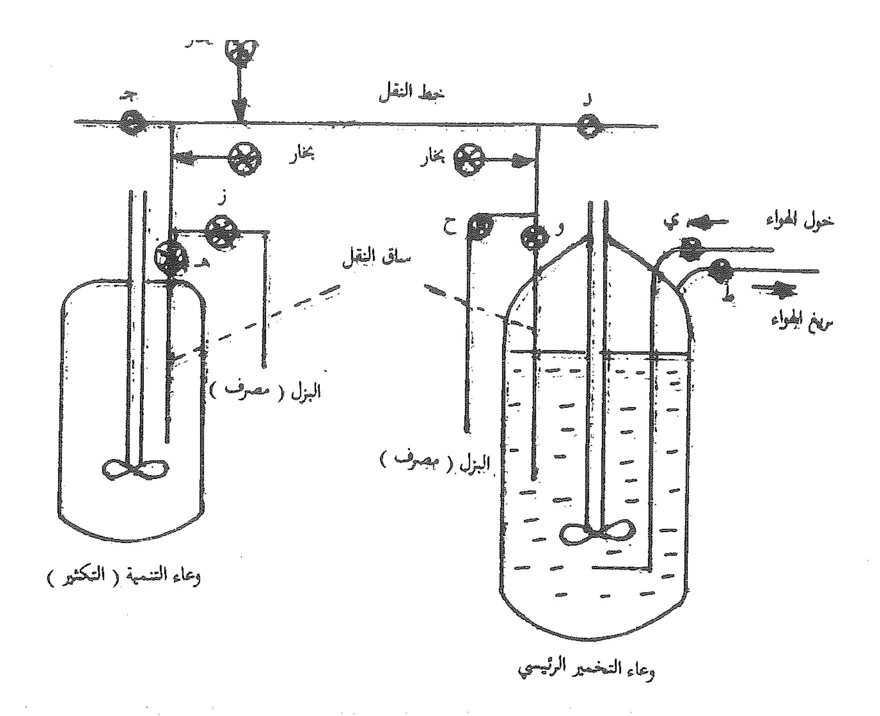
وتمتد أنبوبة العينة ، المغلقة بواسطة صمامين خارجيين (أ) و (ب) على التسلسل ، الى السائل المتحرك بشدة وذلك للسماح بأخذ عينات من البيئة ٠ وهناك خط بخار تحت ضغط يتصل بين هذين الصمامين ، بحيث يستخدم في هذا القطاع من الانبوب بخار تعقيم steam seal وذلك للتمكن من تعقيمه بعد كل عملية سحب عينة ، كما يوفر عائق حراري حيال دخول الاحياء المجهرية الملوثة ٠

ويستخدم نفس الاساس في تعقيم مواضع الاتصال بالتخمر من أجل أضافة المواد المغذية ، واللقاح ، ومواد مانعة الرغاوي أو لنقل البيئة من وعاء الى أخر ٠

وينقل اللقاح المحضر بالطرق التي ستذكر في الفصول القادمة الى مخمر صغير تبلغ سعته الحجمية حوالي 10% من سعة المخمر الرئيسي وله نفس الاساس التصميمي العام للمخمر الكبير الذي سبق وصفه ٠ وعندما تتكون الكمية المرغوبة من الخلايا الميكروبية أو المايسيليوم ، فان محتوى مخمر اللقاح ينقل الى المخمر الرئيس بواسطة ضغط الهواء خلال انابيب نقل معقمة بحيث تتم العملية بأسرع وقت ممكن لتقليل التأثير الضار للتهوية ٠

ويعاثر النقل المعقم بالطريقة المشار اليها في الشكل (11.3) ٠

اذ تغلق الصمامات (ج)و(د)و(هـ)و(و) المتصلة بوعائي تنمية اللقاح والتخمر ، ويسمح للبخار بالدخول الى أنبوب النقل ويمر الى فتحات التصريف خلال الصمامين (ز) و (ح) المفتوحين جزئيا ٠ ويحافظ على الضغط عند 1.1 كغم/سم٢ لمدة 30 دقيقة وبذلك يتم تعقيم أنبوب النقل ٠ بعد ذلك يرفع الضغط في وعاء التخمير بواسطة غلق صمام نافث الهواء (ط) ٠ وعندما يوقف امداد البخار يغلق الصمامان (ز) و (ح) وينفتح الصمامان (هـ) و (و) وتدفع البيئة المعقمة الباردة خلال أنبوب النقل الى وعاء تنمية اللقاح وبانتهاء ذلك يغلق الصمامان (هـ) و (و) ٠



الشكل 11.3 رسم تخطيطي للنقل المعقم بين المخمرات

وتؤدي هذه العملية الى تبريد انبوب النقل وتفرعاته • بعد ذلك يخفض الضغط في وعاء التخمر بواسطة فتح آني مسيطر عليه لصمام دخول الهواء (ي) وصمام المنفث (ط) ، وبذلك يتم رفع الضغط في وعاء تنمية اللقاح بالطريقة الاعتيادية • ومن ثم يفتح الصمامان (هـ) و (و) للسماح للمحتوى الكلي لوعاء تنمية اللقاح لان ينقل الى وعاء التخمير ، ويغلق الصمام (و) • وأخيرا يعقم انبوب النقل ثانية بواسطة البخار بحيث يكون جاهزا لعملية نقل أخرى •

2.3 المخمرات المستخدمة في التخمرات اللاهوائية

fermentots for anaerobic fermentations

من الناحية الاساسية يكون تصميم المخمر لتشغيله تحت الظروف المتسمة بقلة الهواء micro aerophillic او اللاهوائية هو نفس تصميم المخمر اللازم

للتشغيل تحت الظروف الهوائية ، ما عدا بعض الاختلافات التصميمية كالتقليب والتهوية ، أي أن هذه المخمرات لا تستخدم اداة تقليب • ولكن بعض التخمرات اللاهوائية تحتاج الى تقليب أولي للقاح خلال بيئة التخمر في حين لا تحتاج الى تقليب اضافي لان الغازات المتصاعدة من التخمر تقوم بأحداث هذا التقليب •

وتكون الحاجة الى الهواء في بداية التخمر فقط وذلك لتكوين مجموع خلوي كبير قبل أن تصبح الظروف لاهوائية • وفي الحقيقة أن عدم اضافة الهواء ال المخمر لا يعني بالضرورة توفير ظروف لا هوائية للتخمر ، لوجود كمية من الاوكسجين في الفراغ الراسي أعلى بيئة التخمر • وبعض الاحياء المجهرية ، مثل بعض البكتريا المنتجة لحامض اللاكتيك تكون محبة لظروف قليلة الهواء microaerophilic وتستطيع تحمل كميات قليلة من الاوكسجين حتى ولو كان التخمر في الاساس لا هوائيا • في حين ان أحياء مجهرية أخرى ، مثل اعضاء جنس Clostridium وهي لاهوائيات اجبارية لا يمكنها تحمل وجود الاوكسجين • مثل هذه الاحياء يمكنها أن تنمو بنجاح في مخمر بدون أي تغيرات كبيرة في تصميمه أو استخدام أجهزة غالية لازالة الاوكسجين من الجو وخاصة عند اتخاذ الاحتياطات المناسبة • وفي مثل هذه الحالات تستخدم بيئة جيلاتينية سميكة يمكنها اعاقة تغلغل الاوكسجين • اذ تعقم البيئة مباشرة قبل التلقيح بحيث تؤدي الى طرد الاوكسجين ومن ثم يضاف اللقاح من أسفل المخمر مباشرة عند تبريد البيئة الى درجة الحرارة الملائمة للتخمر وقبل أن يكون للاوكسجين فرصة التغلغل الى البيئة • في تخمر من هذا النوع ، فأن غازي ثاني اوكسيد الكربون والهيدروجين يتحرران بتقدم وازدياد شدة التخمر ، وبذلك يطرد الاوكسجين من جو الفراغ الراسي للمخمر • ولغازات التخمر قيمة اقتصادية كبيرة لذلك يجب أن يكون هناك استعداد مسبق لجمعها حال انبعاثها من مخمرات الانتاج •

وكما ذكرنا فأن العديد من التخمرات اللاهوائية تحتاج الى تهوية مبدئية في طور النمو « مثال : الديكستران ، الكحول ، 3,2 ــ بيوتيلين جلايكول » في حين تحتاج الى ظروف قليلة الهواء أو معدومة في الجزء الاخير أو الجزء الانتاجي من عملية التخمر • ونادرا ما توجد عمليات ميكروبيولوجية لاهوائية تماما في الصناعة ، وتخمر بكتريا التيتانوس « الكزاز » هو مثال على ذلك •

مراجع الباب الأول

Aiba, S., Humphrey, A.E., and Millis, N.F. (1965) - Biochemical engineering. Academic Press, New York.

Blakebrough, N. (1967)-Biochemical and biological engineering science science, Vol. 1. Academic Press, London.

Casida, L.E., Jr, (1968) - Industrial microbiology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Demain, A.L. (1981) - Industrial microbiology, Science, 214, 987-995.

Hockenhull, D.J.D. (1975) - The fermentor pilot plant and its aims. Adv. Appl. Microbiol., 19, 187-208.

Johnson, M.J. (1971) - Fermentation - yesterday and tomorrow. Chem. Tech. 1, 338-341.

Miller, B.M., and Litsky, W. (1976) - Industrial microbiology, 3rd ed. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.

Perlman, D. (1974) - Prospects for the fermentation industries, 1974-1983. Chem. Tech. 4 (4): 210-216.

Prescott, S.C. and Dunn, C.G. (1959) - Industrial microbiology, 3rd ed. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.

Rhodes, A., and Fletcher, D.L. (1966) - Principles of industrial microbiology, 1st ed. Pergamon Press, Oxford.

Rose, A.H. (1961) - Industrial microbiology. Butterworths, London.

Solomons, G.L. (1969) - Materials and methods in fermentation. Academic Press, New York.

Solomons, G.L. (1971) - Fermentation equipment. Adv. Appl. Microbiol., 14, 231-247.

Steel, R., and Miller, T.L. (1970) - Fermentor design. Adv. Appl. Microbiol., 12, 153-188.

Thoma, R.W. (1977) - Industrial microbiology. Dowden, Hulchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, Pennsylvania.

Underkofler, L.A., and Hickey, R.J. (1954) - Industrial fermentations. Chemical Publishing Co., Inc., New York.

Wilkinson, J.F., and Rose, A.H. (1963) - Fermentation processes. pp. 395-397. In «Biochemistry of industrial microorganisms». (C. [illegible]ow and A.H. Rose, eds). Academic Press, New York.

PART 2 الباب الثاني

الاسس التي تعتمد عليها عمليات التخمر الصناعي

BASIS OF INDUSTRIAL FERMENTATION PROCESSES



الفصل الأول

فكرة عامة عن الاحياء المجهرية وصفاتها

General Consideration on Microorganisms and Their Characteristics



1. مقدمة Introduction

ان دراسة الاحياء المجهرية كعلم تتضمن دراسة نشاطاتها المختلفة ، ويبحث علم الميكروبيولوجي في صور وتركيب وتكاثر وفسلجة وأيض الاحياء المجهرية والتعرف عليها . كما يتضمن أيضا دراسة انتشارها في الطبيعة وعلاقتها بعضها ببعض وبالاحياء الاخرى فضلا عن تأثيراتها المفيدة والضارة في الانسان والتغيرات الفيزياوية والكيمياوية التي تحدثها في بيئاتها .

وتوجد الاحياء المجهرية في كل مكان في الطبيعة ، فهي تحمل بواسطة تيارات الهواء من سطح الارض الى الاجواء العليا . وقد وجدت في رواسب باطن المحيطات رغم اعماقها السحيقة ، وكذلك في التربة الارضية . وتنقل الاحياء المجهرية بواسطة الجداول والانهار الى البحيرات والاجسام المائية الكبيرة ، واذا أفرغت فضلات الانسان المحتوية على البكتريا الضارة في الجداول فقد تنتشر الامراض من مكان الى آخر . وتوجد الاحياء المجهرية بوفرة اينما وجد الغذاء والرطوبة والحرارة المناسبة لنموها وتكاثرها . ونظرا لكون الظروف المشجعة لمعيشة ونمو العديد من الاحياء المجهرية هي تلك التي يعيش الانسان في ظلها ، فمن المؤكد اننا نعيش وسط حشد غفير جدا من الميكروبات . فهي موجودة في الهواء الذي نتنفسه والغذاء الذي نتناوله ، وتوجد على سطوح اجسامنا وفي جميع ملابسنا وافواهنا وانوفنا وأية فتحات جسمية أخرى . ولسوء الحظ ان أغلب الاحياء المجهرية تعد ضارة لنا ، الا اننا نمتلك طرق مقاومة اجتياح تلك الاحياء الضارة جدا .

وقد سبق وأن ذكر ان عددا من الاحياء المجهرية اثبت أهمية صناعية وتجارية وطبية كبيرة سواء كانت بكتريا أو خمائر أو أعفان أو طحالب .

2. تقسيم الاحياء المجهرية Classification of Microorganisms

بالرغم من أوجه التشابه العديدة فان هناك اختلافات كبيرة بين الاحياء . وعلى أساس هذه الاختلافات ، يمكن تقسيم معظم الاحياء الى مملكتين نباتية وحيوانية . ومن أهم الاختلافات الواضحة والمهمة بين النباتات والحيوانات هي :-

1. تمتلك الخلايا النباتية جدرا صلبة في حين تكون الجدر الحيوانية مرتبطة بغشاء مرن .
2. لا تكون النباتات متحركة بفاعلية في حين تعد معظم الحيوانات متحركة .

3. تحتوي النباتات فقط على الكلوروفيل وتقوم بعملية التخليق الضوئي أي يمكنها تخليق الكربوهيدرات من ثاني اوكسيد الكربون والماء في وجود ضوء الشمس ·
في حين لا يمكن أن تقوم الحيوانات بهذا العمل وعليه ينبغي ان تحصل على الطاقة من المواد العضوية ذات الاصل النباتي ·

4. تخزن النباتات غذاءها في صورة نشافي حين يعد الجلايكوجين والدهن الاغذية المخزونة الرئيسة في الحيوانات ·

وبصورة عامة تقع الاحياء المجهرية التي يهتم بها المختص في علم الميكروبيولوجي تحت قسمي Protophyta و Thallophyta من المملكة النباتية وقسم Protozoa من المملكة الحيوانية · وفي الواقع هناك عوامل (فيروسات) يصفها بعض الباحثين انها كائنات حية في حين يصفها البعض الاخر انها غير حية · ونظرا لوجود كائنات حية لا تقع من الناحية الطبيعية تحت اي من المملكتين النباتية أو الحيوانية ، فقد أقترح لها مجموعة أو مملكة ثالثة أنشئت لتضم جميع هذه الاحياء التي لا تعد من النباتات أو الحيوانات · في عام 1866, اقترح عالم الحيوان الالماني هيكل Haeckel مملكة البدائيات أو الاوليات Protista لتضم جميع الاحياء وحيدة الخلية التي سبق وضعها في قسم Thallophyta من المملكة النباتية وفي قسم Protozoa من المملكة الحيوانية · وتتصف البدائيات أو الاوليات Protists بافتقارها الى ترتيب خلوي محدد فضلا عن العجز في التمييز بين الخلايا بالنسبة لوظيفة ايضية معينة .

وتضم مملكة الاوليات : البكتريا والفطريات والطحالب والبروتوزوا · كما يمكن تقسيم الاحياء المصنفة كأوليات الى فئتين هما ، احياء بدائية النواة Procaryota واحياء حقيقية النواة Eurarxota ، ويقوم هذا التقسيم على أساس الاختلاف في تشريحها الخلوي ، ان ال Procaryota هي أحياء لها نوع بدائي من النواة المفتقرة الى غشاء محدد الوضوح ، اذ يكون الانقسام النووي فيها أقل تعقيدا من الانقسام الاعتيادي Mitosis ، كما ان تنظيمها الجيني يكون أقل تحديدا من ذلك الموجود في كروموسومات الاحياء الراقية · ومن ضمن الاحياء البدائية النواة البكتريا والطحالب الخضراء الزرقاء · في حين تمتلك الاحياء الحقيقية النواة غشاء نوويا محددا وكروموسومات وتظهر انقساما خلويا اعتياديا ·

مثل هذه الخلايا توجد في البروتوزوا والفطريات والطحالب (باستثناء الطحالب الخضراء الزرقاء) ·

وفي هذا المجال سنقتصر المناقشة على الفطريات والخمائر والبكتريا والطحالب ·

3. الفطريات Fungi

يعتبر البعض الفطريات أنها نباتات لا تتميز بجذور وسيقان وأوراق · ونظرا لعدم وجود الكلوروفيل في خلاياها فانها غير ذاتية التغذية Heterotrophs اذ تحصل على غذاءها اما من مواد عضوية غير حية اي رمية التغذية Saprophytes أو بالعيش على عوائل حية أي طفيلية التغذية Parasites. · والى حد الان تم التعرف على حوالي 100,000 نوع من الفطريات · وتنتشر الفطريات في كل مكان تقريبا ولها تأثير عميق في بيئاتها · فهي تفسد الاخشاب والاوراق والانقاض الاخرى مكونة الدبال الذي يعزز التربة ، كما تنفث غاز ثاني أوكسيد الكربون الى الجو حيث تستفيد منه النباتات الخضراء · وتستخدم الفطريات في الصناعات التخمرية لانتاج الاحماض العضوية والانزيمات والكحولات ومركبات أخرى عديدة ، كما تعد مصدرا لبعض المضادات الحيوية · وتسبب الفطريات اذا تركت دون سيطرة أو تحكم في تلف الاخشاب والنسيج والحبال والمواد العازلة الكهربائية ومواد عديدة أخرى ذات أهمية تجارية وصناعية · وتسبب الفطريات أمراضا للنبات والانسان وحيوانات أخرى · وكما هو الحال مع الاحياء المجهرية الاخرى فقد تكون الفطريات قوة مفيدة أو ضارة تبعا للانواع المشتركة ·

1.3. تقسيم الفطريات والتعرف عليها :

تشابه الفطريات النباتات في بعض الوجوه والحيوانات في وجوه أخرى ، وهذه الاختلافات تعد كافية لكي تجعل من تقسيمها أمرا غير سهل · ويعتقد بعض المختصين في علم الفطريات انها طحالب فقدت كلوروفيلها وبالتالي قدرتها في أداء عملية التخليق الضوئي · ويجادل مختصون آخرون في ان الفطريات والبروتوزوا قد بدأ من اسلاف مألوفة ولكنهما انفصلا في عملية التطور · وبناء عليه ، اذا كانت المجموعة الاولى صحيحة في اعتقادها فان الفطريات هي نباتات

ولكن اذا كانت المجموعة الثانية هي الصحيحة فيما تعتقد فان الفطريات تعد من البدائيات • وقد تكون عائديتها الى مملكة البدائيات **Protista** التي تضم جميع الثالوسيات الوحيدات الخلية ، هو الحل الملائم والمنطقي للاراء المختلفة حول كون الفطريات من النباتات أو الحيوانات •

وقبل الدخول في تقسيم الفطريات ينبغي التعرف على بعض الصفات المتبعة في التعرف عليها والتمييز بينها وهي :ـ

1. الهيفا مقسمة أو غير مقسمة •
2. الميسليوم شفاف أو معتم •
3. الميسليوم ملون أو عديم اللون •
4. امكانية تكوين سبورات جنسية ونوعها : بيضية Oospores أو لاقحية (زيجية) Zygospores أو كيسية (زقية) Ascospores. •
5. نوع السبورات اللاجنسية : حافظية (منطاة) Sporangiospores أو كونيدية Conidia أو مفصلية Athrospores. •
6. صفات الرؤوس السبورية :

أ) الحافظات السبورية : الحجم واللون والشكل والموقع •

ب) الرؤوس السبورية الحاملة للكونيديات : كونيديات مفـردة أو سلاسل أو كونيديات متبرعمة أو كتل ، شكل وترتيب الذنيبات •

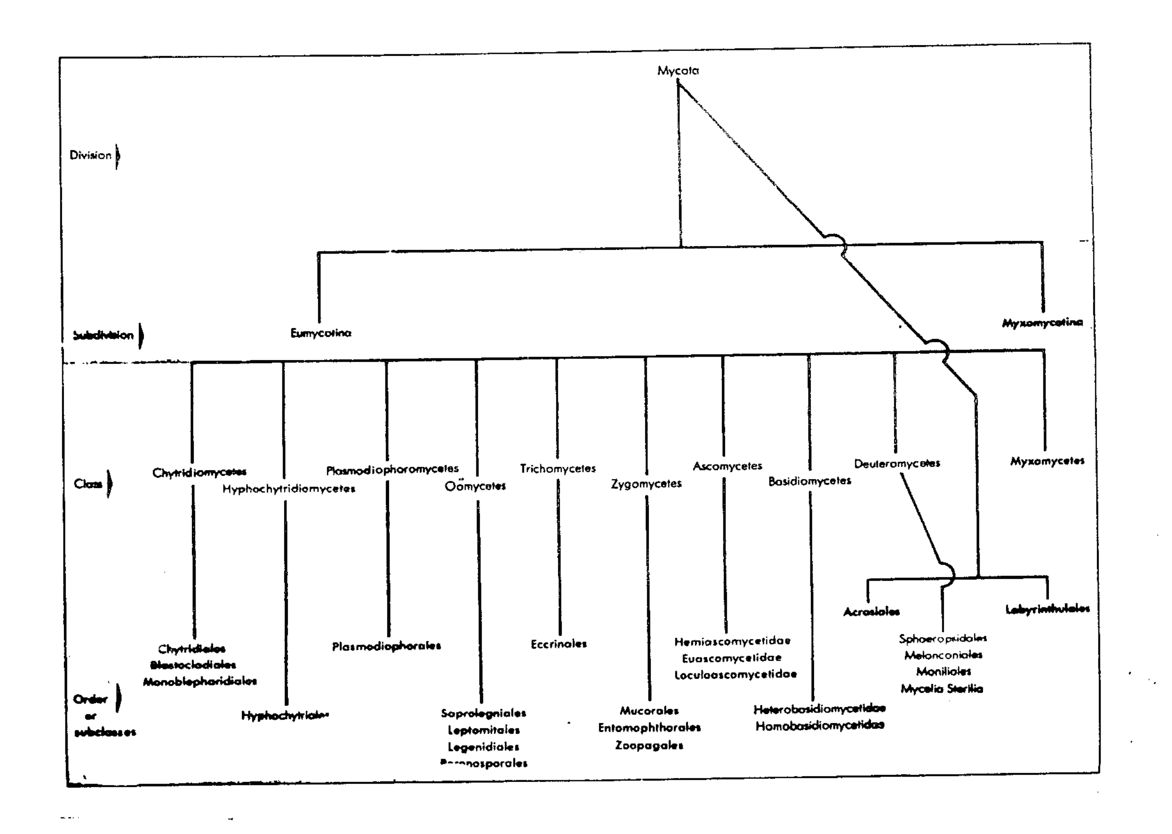
7. المظهر المجهري للسبورات اللاجنسية وخصوصا الكونيدية : الشكل والحجم واللون والنعومة أو الخشونة والخ •
8. المظهر المجهري للحوامل الحافظية أو الحوامل الكونيدية : بسيطة أو متفرعة أو مركبة •
9. وجـود تراكيب خاصـة (أو سبورات) : المداد Stolon ، أشباه الجذور Rhizoids ، الخلايا القدمية Foot cells ، السبورات الكلاميدية Chlamydospores ، والكتل الصلبة Sclerotia والخ •

ان التقسيم الاكثر قبولا للفطريات هو ذلك الموضح من قبل C. J. Alexopoulos في كتابه "Introductory Mycology". • وبناء على ذلك فان الفطريات تعود

الى القسم Mycota (في مملكة البدائيات) الذي بدوره ينقسم الى تحت القسم Eumycotina اي الفطريات الحقيقية True fungi وتحت القسم Myxomycotina اي الفطريات اللزجة الحقيقية True slime molds. • ويضم تحت القسم Eumycotina ثمانية صفوف Classes وصورة صف واحدة Form-class وذلك على أساس المميزات المورفولوجية والطرق المختلفة لتكاثرها •

ويبين الشكل (1.1) الوضع التقسيمي للفطريات مع بعض الامثلة عن المجاميع الرئيسة فيها • كما يبين الجدول (1.1) التقسيم المبدئي لبعض الفطريات الحقيقية • ويشمل تحت القسم Myxomycotina الصف Myxomycetes الذي له اثنان مما تحت الصف يختلفان في طريقة تكوين السبورات حيث يحمل تحت الصف الاول سبوراته بصورة خارجية على الحوامل الفردية ويحمل الثاني سبوراته داخليا •

وعلى أساس المعرفة الحالية فان تقسيم الفطريات اللزجة المختلفة يعد غير منتظم بدرجة كبيرة • وان الاختلافات بينها كبيرة جدا لدرجة ان الفطريات اللزجة المتطفلة داخليا توضع في صف Plasmodio phoromycetes في تحت القسم Eumycotina. • كما ان الفطريات اللزجة الخلوية لم تضم الى ما تحت القسمين المذكورين في الشكل (1.1) ، وانما وضعت في رتبة Acrasiales. • وبطريقة مماثلة فان الفطريات اللزجة الشبكية أحتلت رتبة سميت **Labyrinthulales**.



الشكل (1.1) • الوضع التقسيمي للفطريات

الجدول (1.1)

التقسيم المبدئي لبعض الفطريات الحقيقية

Kingdom: Protista
 Division: Mycota
  Subdivision: Eumycotina
   Class: Chytridiomycetes
    Order: Chytridiales
     Blastocladiales
     Monoblepharidiales
   Class: Hyphochytridiomycetes
    Order: Hyphochytriales
   Class: Oömycetes
    Order: Saprolegniales
     Leptomitales
     Legenidiales
     Peronosporales
   Class: Plasmodiophoromycetes
    Order: Plasmodiophorales
   Class: Zygomycetes
    Order: Mucorales
     Entomorphthorales
     Zoopagales
   Class: Trichomycetes
    Order: Eccrinales
   Class: Ascomycetes
    Subclass: Hemiascomycetidae
     Euascomycetidae
     Loculoascomycetidae
   Class: Basidiomycetes
    Subclass: Heterobasidiomycetidae
     Homobasidiomycetidae
   Form-class Deuteromycetes
    Form-order: Sphaeropsidales
     Melanconiales
     Moniliales
     Mycelia Sterilia

وسنركز اهتمامنا فيما يلي على الفطريات الحقيقية وخصوصا المهمة منها ميكروبيولوجيا • وبصورة عامة يطلق على الفطريات اسم اعفان Molds • وبالرغم من أن المصطلح عفن غير معرف بدقة الا ان معظم البيولوجيين يعتبرون جميع الفطريات الخيطية الصغيرة والتي تكون جميعها متعددة النوى ، اعفانا • ويتعرف على العديد من هذه الاعفان بواسطة المظهر القطني لميسليومها الخضري • وفيما يلي نبذة مختصرة عن كل صف من صفوف الفطريات الحقيقية :ـ

1. صف الفطريات الكيتريدية Class Chytrimiomycetes — تتميز فطريات هذا الصف باحتوائها على خلايا (Zoospores أو Planogametes) متحركة بواسطة سوط طرفي خلفي واحد • يعيش معظمها في البيئات المائية الا ان بعضها يعيش في التربة • وهي ميكروسكوبية الحجم ، والعديد منها مترمم الا ان بعضها متطفل على الطحالب مسببا تلفها ، ولا تعد مهمة من الناحية الاقتصادية بصورة مباشرة • ويضم هذا الصف ثلاث رتب •

2. صف الفطريات Class Hyphochytridiomycetes — هناك 15 نوعا من الفطريات المائية تتحرك بواسطة سوط في مقدمة الخلية • وبعض أفراد هذا الصف يكون متطفلا على الطحالب والفطريات في حين يكون البعض الاخر مترمما •

3. صف الفطريات البيضية Class Oömycetes — ينقسم هذا الصف الى اربع رتب جميعها مائية ولكن بعضها أرضية • قد يسبب المتطفل منها أمراضا للاسماك والبعض الاخر يسبب أمراضا للنبات • لافراد هذا الصف أهمية اقتصادية كبيرة • وتتكاثر الفطريات البيضية جنسيا ولا جنسيا ، وغالبا ما يكون التكاثر الجنسي بواسطة خلايا مختلفة الامشاج Heterogametangic • ان تكوين السبور البيضي Oöspore في الحافظات البيضية Oogonia يعد سمة لمعظم فطريات هذا الصف •

4. صف الفطريات Class Plasmodiophoromycetes — ويضم هذا الصف الفطريات اللزجة المتطفلة داخليا والتي تتطفل على النباتات الوعائية

والطحالب المائية والفطريات المائية . وهناك رتبة واحدة وعائلة واحدة في هـذا الصف ولكن تم تعيين تسعة أجناس منها . وكانت هذه الفطريات قد وضعت سابقا مـع الـ Myxomycetes أو الفطريات اللزجـة الحقيقية ، الا ان الاختـلافات البيولوجية في تكاثرها وتركيب الجدار الخلـوي وأصلها بررت وضعها في صف منفرد .

5. صف الفطريات اللاقحية (الزيجية) Class Zygomycetes — ويتميـز أفراد هذا الصف بتكوين سبورات جنسية تدعى السبورات اللاقحية Zygospores وذلك بواسطة اتصال الخلايا المشيجية ، كما وتتكاثر لا جنسيا بواسـطة سبورات حافظية Sporangiospores أو كونيديات . وأساسا تعد هذه الفطريات أرضية وقسم منها مترمم بينما البعض الاخر متطفلات اجبارية أو نفعية . ويضم هــذا الصف ثلاث رتب هي Mucorales و Entomophthorales و Zoopagales. وتعد رتبة Mucorales ذات أهمية خاصة للمتخصص في علـم الميكروبيولوجي لاهميتها الصناعية والبستنية . وأن جميع أفراد رتبة Mucorales هي مترممات والعديد منها مفيد في تخليق بعض المواد الكيمياوية ذات القيمة الكبيرة مثـل الكحولات وحامض الفيوماريك وحامض اللاكتيك وحامض الاوكزاليك وعدد آخر من المنتجات . ويشترك في جميع هذه العمليات الصناعية الفطر Rhizopus stolonifer (R. nigricans), والفطر R. oryzae . ويتطفل بعض أفراد رتبـة Mucorales على الفواكه والخضراوات النامية ، فيما يهاجم البعض الاخـر الفواكه عند التخزين . وقد وجد ان بعض الامراض العصبية التي تصيب الانسان قد تكون بسبب بعض اعضاء رتبة Mucorales . أما الفطريات العائدة الى رتبة Entomophthorales فانها عادة متطفلة على الحشرات والمثال الشائع عنها هو فطر الذبابة **Entomophthora muscae** بينما تكون الاجناس الاخـرى متطفلة على الانسان وبعض الحيوانات الاخرى والنباتات الواطئة .

وتحتوي رتبة Zoopagales على عائلة واحدة ذات عشرة أجناس وتكـون متطفلة على الحيوانات الواطئة كالبروتوزوا والنيماتودا . ويتكاثر بعضها لا جنسيا بواسطة السبورات الكلاميدية Chlamydospores ، في حين يتكاثر البعض

الاخر الذي يعد متباين الثالوس Heterothallic بواسطة التكوين الجنسي للسبورات الزيجية .

6. صف الفطريات Class Trichomycetes — لم تدرس هذه الفطريات بتوسع وذلك للنقص في المعلومات الخاصة عن تحديد ملامحها . وعلى اساس المعرفة الحالية فان جميع اعضاء هذا الصف متطفل أو مؤاكل Commensals على الحيوانات المفصلية حيث تتصل فيها بالقناة المعوية او بالبشرة . وقد وضعت رتبة واحدة في كتاب Alexopoulos هي رتبة Eccrinales . ان اجسام هذه الفطريات طويلة ورفيعة وغير متفرعة ، وتتكاثر لا جنسيا في حين لم تلاحظ اية ملامح للتكاثر الجنسي .

7. صف الفطريات الكيسية (الزقية) Class Ascomycetes -- قد تدعى فطريات هذا الصف في بعض الاحيان بالفطريات الكيسية Sac fungi وتتميز بان الميسليوم يكون أكثر تطورا الا في حالة الخمائر ومقسم بفواصل عرضية تفصل الخلايا عن بعضها . وتتكاثر هذه الفطريات بواسطة السبورات الكيسية Ascospores التي تنتج بعد الانقسام الاختزالي الذي يعقب التكاثر الجنسي . وتنتج السبورات الكيسية في أكياس Asci (ومفردها Ascus) . ويضم صف الفطريات الاسكية ثلاثة مما تحت الصف Sub-classes مصنفة على أساس طريقة تكوين الكيس وتركيبه . اذ يضم ما تحت الصف Hemiascomycetidae الخمائر مثل Saccharomyces وتنتج اكياسا عارية ، بينما ينتج ما تحت الصف Euascomycetidae وما تحت الصف Loculoascomycetidae اكياسا في ثمار كيسية Ascocarp .

ان الفطريات الكيسية وخصوصا الخمائر مهمة للانسان بطرق متعددة ، حيث أن استخدامها في الصناعات التخمرية وصناعة الخبز وصناعة البيرة وكمصدر مهم للمواد الغذائية للانسان معروف جيدا . الا انها تشترك أيضا في اختزال النباتات الميتة الى دبال وفي هضم السليلوز في الخشب والمخلفات الاخرى . وتعد الفطريات الكيسية الاخرى ممرضة للنباتات _تكون مسئولة عن العديد من الامراض مثل مرض جرب التفاح وصدأ الحبوب وغيرها .

٥. صف الفطريات البازيدية Class Basidiomycetes — تتميز هذه الفطريات بوجود تركيب حامل للسبورات يعرف بالبازيدة Basidium محمولة عند الطرف البعيد من الهيفا الثنائية النواة • وتحتوي البازيدات على انوية تخضع للانقسام الاختزالي ، والانوية الاحادية المجموعة الكروموسومية Haploid الناتجة أو سليلاتها تنحصر ضمن السبورات البازيدية Basidiospores • وتعد الاصداء rusts, والتفحمات Smuts, والفطريات الهلامية Jelly fungi امثلة للفطريات البازيدية • وتكون بعض الفطريات البازيدية (وخاصة ما تحت الصف Heterobasidiomycetidae) مسئولة عن تلف الابنية الخشبية مثل قضبان ربط السكة الحديدية واعمدة التلفون • وبعض الانواع المتطفلة مثل الاصداء والتفحمات النتنة تتلف محاصيل الحنطة والبعض الاخر يهاجم اشجار الفاكهة ونباتات الزينة • والفطريات الموجودة في ما تحت الصف Homobasidiomycetidae تضم فطريات كبيرة ترى بالعين المجردة ومن أمثلتها العرهونات Mushrooms والقرون النتنة Stinkhorns, وغيرها التي ليست ذات أهمية معينة بالنسبة للميكروبيولوجيين •

٦. صورة صف الفطريات الناقصة Form-Class Deuteromycetes —

تضم الفطريات الناقصة Fungi Imperfecti أكثر من 10,000 صورة نوع حيث صنفت سوية لعدم معرفة التكاثر الجنسي فيها • وقد تعد الفطريات الناقصة أطوارا كونيدية للفطريات الكيسية أو فطريات بازيدية لم يكتشف بعد طورها الجنسي • وتحتوي صورة الرتبة Moniliales العائدة لصورة الصف Deuteromycetes على الاف من صورة النوع اذ ان العديد منها يعد مهما من الناحية الصناعية والطبية • كما أن بعض صور الانواع تكون ممرضة للنبات والبعض الاخر ممرضة للحيوان •

الفطريات اللزجة The Slime Molds :

نعود ثانية الى وصف فطريات الصف Myxomycetes المسماة بالفطريات اللزجة الحقيقية • ولاعضاء هذه المجموعة تشابه بسيط ببعض الاعفان عدا كونها منتجة للسبورات • وبسبب تشابهها مع الاميبا في جوانب معينة فان البعض قد

يصنفها كحيوانات ويطلق عليها الاسم Mycetozoa أو الحيوانات الفطرية Fungus animals .

من الملامح المميزة للفطريات اللزجة هو أن طورها الخضري عبارة عن كتلة بروتوبلازمية عارية متعددة النوى تدعى البلازموديوم Plasmodium. ويتباين هذا الجسم اللزج في الحجم واللون وقد يغير شكله عندما يزحف على المواد التي ينمو عليها . ويحصل الفطر على غذائه بتناوله البكتريا وسبورات الفطريات الاخرى واية مادة متناهية الدقة . كما قد يحصل على الغذاء من المواد العضوية في التربة والاوراق الميتة والاجزاء الخشبية البالية التي ينمو عليها .

وتحت الظروف البيئية المناسبة تتحرك البلازموديات بطريقة الاميبا آخذة الغذاء نامية في الحجم . وعندما تصبح الظروف غير مؤاتية للنمو فان الفطر قد يصبح غير نشط ويكون كتلة صلبة Sclerotium سميكة ولكنها ليست لزجة - وعند عودة الظروف المؤاتية فانه يصبح على شكل بلازموديم ثانية . ويبدو ان الظروف البيئية تؤثر في بدء عملية تكوين السبورات .

وتتباين الحافظات السبورية Sporangia بين الانواع . فالبعض منها يحمل على حوامل تنشأ من البلازموديوم الذي يصبح كثيفا ومجعدا وقد يعطي عقدا صغيرة تعمل كقاعدة للحامل القصير لكي ينبثق ويبزغ . وتتكون الحافظة السبورية على هذا الحامل ، وفي بعض الانواع قد تتكون الحافظة السبورية مباشرة من البلازموديات بدون أي حامل . وغالبا ما تكون الحافظات السبورية كبيرة الى درجة يمكن رؤيتها بالعين المجردة كما قد تكون مخضبة . وعندما تنضج الحافظات السبورية يتكون عدد من السبورات الفردية التي تنبت عندما تقع على مادة غذائية مناسبة . وينتج كل سبور بين خلية الى اربعة خلايا تتميز بوجود أسواط فيها ، تنقسم الى حالة اميبية تالية وتعمل كمشيجات Gametes . وبعد الاندماج الجنسي تنقسم اللاقحات Zygotes انقساما اعتياديا عدة مرات ومن ثم تتطور الى بلازموديات متممة بذلك دورة الحياة .

وفضلا من أهميتها كانواع بيولوجية مهمة ودورها في تفسخ وتهريء النباتات والحيوانات الميتة ، فان بعضا منها يكون متطفلا على النباتات الراقية .

الحية للنبات العائل ٠ وتحدث الاصابة عندما ينفذ السبور السابح Zoospore في جذير النبات العائل مثل اللهانة ويصبح في الحال اميبا لزجة Myxameba وينمو الى بلازموديوم ٠ ان زيادة حجم البلازموديات تؤدي الى انتفاخ بذور النبات العائل ٠ وبتقدم الاصابة يحدث انقسام نووي مؤديا في نهاية الامر الى تكوين السبورات التي تقيم في خلية العائل حتى موت وتفسخ العائل ٠ وبالتالي تنطلق السبورات وتصبح حرة في أصابة بادرات جديدة ٠

الرتبة Acrasiales —

وهي الفطريات اللزجة الخلوية التي تكون حرة المعيشة وشبيهة بالاميبا وبدون أسواط ولا تكون بلازموديااتها متعددة النوى ٠ وبسبب هذه الاعتبارات واختلافات أخرى بين الفطريات اللزجة ، فقد صنفت هذه الفطريات بصورة منفصلة عن الاخريات ٠

الرتبة Labyrinthulales —

أستثنيت أفراد هذه الرتبة أيضا مما تحت القسم Eumycotina وما تحت القسم Myxomycotina. ٠ ويطلق على هذه الفطريات اسم الفطريات اللزجة الشبكية Net slime molds بسبب ترسيبها لمادة لزجة بشكل شبكة رقيقة على السطوح التي تنمو عليها ٠ وغالبا ما يكون لخلاياها شكل بيضوي أو شبيه بالمغزل ٠ وهذه الاحياء مألوفة جدا في البيئات البحرية حيث تنمو كمتطفلات أو مترممات على الطحالب البحرية ٠

٢ـ٢ الصفات العامة للاعفان :

ان الاختلاف المورفولوجي الرئيس بين الفطريات التي نسميها اعفانا والفطريات الاخرى هو أن التراكيب الثمرية للاعفان تكون خيطية بشكل واضح في حين ان تلك التي لا ندعوها أعفانا مثل الفرطون Mushroom, تكون أجساما ثمرية لحمية ٠ ان المصطلح (عفن mold) شائع جدا ويستعمل للدلالة على الفطريات الخيطية المتعددة الخلايا التي يمكن تمييز نموها على الاغذية بسهولة بواسطة مظهرها الزغبي أو القطني ٠ ويبدو الجزء الرئيس من النمو بلون ابيض

وقد يكون ملونا او داكنا او بلون دخاني • والسبورات الملونة هي نموذج لنباتات العفن الناضجة من بعض الانواع وتعطي اللون الى جزء من النمو أو اليه باكمله •

1.2.3 الصفات المورفولوجية –

تستخدم مورفولوجية الاعفان ، اي الشكل والتركيب ، التي تحكم بواسطة مظهرها العياني أو المجهري في تشخيصها وتصنيفها •

(أ) الهيفات والميسليوم Hyphae and Mycelium —

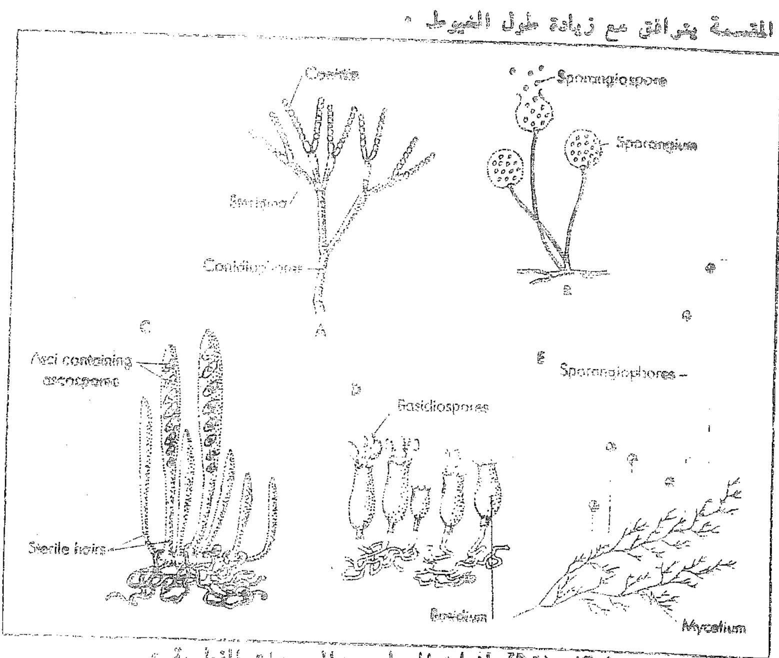
يتألف نبات العفن من كتلة متفرعة خيطية تدعى هيفات Haphae (مفردها هيفا Hypha) في حين يطلق على الكتلة الكلية لهذه الهيفات اسم الميسليوم Mycelium. • وقد تكون الهيفات مغمورة Submerged اي تنمو خلال الغذاء ، أو هوائية Aerial أي تنمو فوق الغذاء • وقد تصنف الهيفات أيضا الى هيفات خضرية Vegetative اي النامية وبذلك تكون متخصصة بتغذية العفن ، أو هيفات خصبة Fertile اي تكون متخصصة بانتاج الاجزاء التكاثرية • وفي أغلب الاعفان تكون الهيفات الخصبة هوائية الا انها قد تكون في البعض الاخر مغمورة • وتكون هيفات بعض الاعفان ممتلئة وملساء في حين ان هيفات البعض الاخر رفيعة وخشنة • وتنتج أنواع قليلة من الاعفان كتلا صلبة Sclerotia (مفردها Sclerotium) وهي كتل محكمة الحشو من هيفات محورة وغالبا ما تكون رقيقة الجدران ضمن الميسليوم • وتعد هذه الكتل الصلبة نوعا ما اكثر مقاومة للحرارة والظروف غير المؤاتية مقارنة ببقية الميسليوم ، ولهذا السبب تكون مهمة في بعض منتجات الاغذية المصنعة •

ويظهر الفحص المجهري لهيفات العفن صفات مهمة في تشخيص الاجناس • ويوضح الشكل (2.1) والشكل (3.1) انواع الميسليوم الفطري وأنواع الهيفات على العاقب • وتقسم الاعفان الى مجموعتين : مقسمة Septated اي وجود جدران عرضية تقسم الهيفا الى خلايا ، وغير مقسمة Non-septated اي تظهر الهيفات بشكل اسطوانات وبدون جدر عرضية • وللهيفات غير المقسمة نوى منتشرة خلالها بحيث تعد متعددة الخلايا • ان هيفات معظم الاعفان شفافة الا ان البعض منها داكن أو بلون دخاني • وقد تبدو الهيفات غير ملونة وشفافة عند

الضغط الانتفاخي [illegible]

المهيفة .

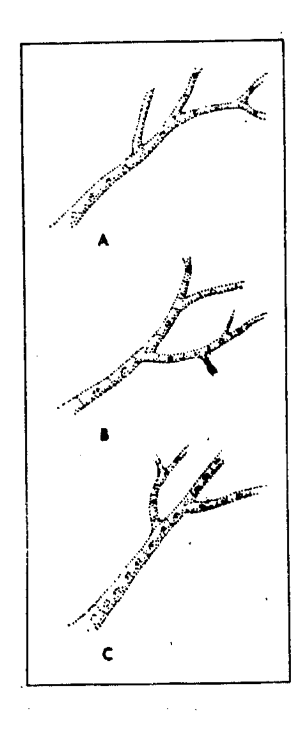
وتزداد الهيفات المقسمة في الطول بواسطة انقسام الخلية الرأسية أو القمية (نمو قمي) أو انقسام الخلايا ضمن الهيفا (نمو بيني Intercalary growth) ونوع النمو هو صفة لنوع العفن . ان انقسام النوى الزائدة خلال الهيفات غير المقسمة يترافق مع زيادة طول الخيوط .



الشكل (2.1) انواع المسليوم والسبورات الخارجية .

(A. الاجسام الثمرية لل Penicillium ; B. الاجسام الثمرية لل Rhizopus ; C. مقطع في ال Ascomycetes ; D. مقطع للفطر من ال Basidiomycetes ; E. الحوامل الحافظية والمسليوم في عفن Mucor.)

وتفيد بعض التراكيب أو الاجزاء الخاصة للمسليوم في تشخيص الاعفان ومن الامثلة على ذلك هي اشباه الجذور rhizoids لعفن Rhizopus وعفن Aspergillus. والخلية القدمية foot cell في عفن Absidia والشكل المتفرع dichotomous أو الشبيه بالحرف (Y) في عفن Geotrichum .



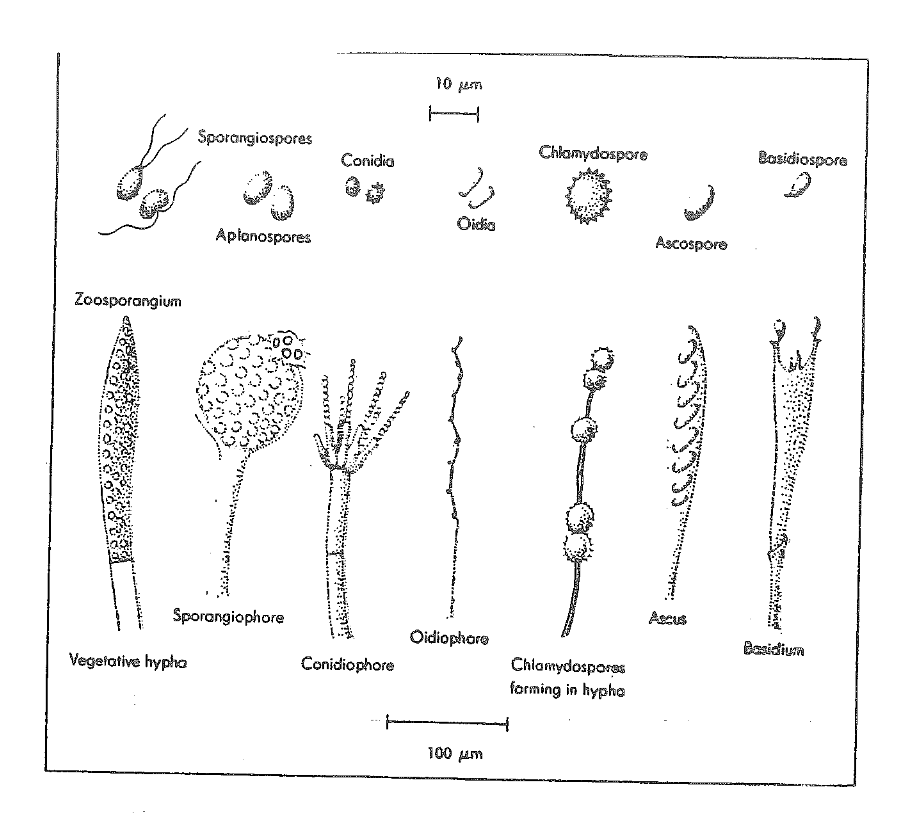
الشكل (3.1) ثلاثة أنواع مورفولوجية للهيفات
A. غير مقسمة ·
B. مقسمة الى خلايا وحيدة النوى ·
C. مقسمة الى خلايا متعددة النوى ·

(ب) الاجزاء او التراكيب التكاثرية ـ

يمكن للاعفان انتنمو من قطعة منزرعة من الميسليوم ولكن نادرا ما يحدث ذلك · انتكاثر الاعفان يكون بالدرجة الاساس بواسطة السبورات اللاجنسية كما ان بعض الاعفان يكون سبورات جنسية ·

ويقال عن مثل هذه الاعفان بانها تامة او كاملة وتصنف اما الى فطـريات بيضية Oomycetes أو فطريات لاقحية Zygomycetes اذا كانت غير مقسمة او الى فطريات كيسية Ascomycetes أو فطريات بازيدية Basidiomycetes اذا كانت مقسمة بالمقارنة مع الاعفان أو الفطريات الناقصة التي تكون اساسـا مقسمة ولها سبورات لا جنسية فحسب · ويوضح الشكل (4.1) انواع السبورات في الفطريات ·

وتنتج الاعفان سبورات لا جنسية باعداد كبيرة تكون صغيرة وخفيفة ومقاومة للجفاف · وتنتشر هذه السبورات بسهولة خلال الهواء لتحط ثانية وتبدأ في تكوين نباتات عفن جديدة حيثما تكون الظروف ملائمة · ان الانواع الثلاثة الرئيسة من



الشكل (4.1) . انواع السبورات في الفطريات

(1) الكونيديات Conidia (مفردها Conidium) .

(2) سبورات مفصلية arthrospores أو اويديات oidia (مفردها اويديا(Oidium)) .

(3) سبورات حافظية Sporangiospores. .

وتعد الكونيديات قطعا أو براعما من الهيفات الخصبة تدعى بالحوامل الكونيدية Condidiophores وعادة ما تكون مفتوحة اي لا تقع ضمن اية حاوية كما هو الحال مع السبورات الحافظية الموجودة في الحافظة السبورية Sporangium (جمعها حوافظ سبورية Sporangia) او في كيس في قمة الهيفا الخصبة يسمى بالحامل الحافظي Sporangiophore. .

وتتكون السبورات المفصلية Arthrospores من تكسر او تجزئة الهيفا بحيث تصبح خلايا الهيفا ارثروسبورات . أما النوع الرابع من السبورات اللاجنسية فهي السبورات الكلاميدية Chlamydospores التي تكونها العديد من أنواع العفن عندما تقوم خلية هنا أو هناك في المايسيليوم بتخزين غذاء احتياطي ، فتنتفخ وتكون جدرانا أسمك من تلك الموجودة في الخلايا المحيطة . وعليه فان السبور الكلاميدي هو خلية في دور راحة أو سكون يمكنها تحمل الظروف غير المؤاتية بصورة افضل من ميسليوم العفن الاعتيادي ولكن فيما بعد وعندما تتهيأ ظروف مؤاتية فان هذا السبور ينمو مكونا نبات عفن جديد .

وتفيد مورفولوجية السبورات اللاجنسية في تشخيص اجناس وأنواع الاعفان وتتباين السبورات الحافظية في الحجم والشكل واللون . أما الكونيديات فانها لا تختلف في مثل هذه الاشياء ولكنها قد تكون ملساء أو خشنة أو قد تكون مفردة او مزدوجة أو متعددة الخلايا .

وكذلك يفيد مظهر الهيفات الخصبة والسبورات اللاجنسية الموجودة عليها في تشخيص الاعفان . واذا تكونت السبورات الحافظية ، ينبغي ملاحظة ما اذا كانت بسيطة أو متفرعة وكذلك نوع التفرع وحجم وشكل ولون وموقع الحوافظ السبورية . ويدعى الرأس المنتفخ من السبور المغطى بالعويميد Columella الذي يبرز في الحافظة السبورية متخذا اشكالا نموذجية لانواع العفن . وقد تحمل الكونيديات مفردة على الحوامل الكونيدية أو في رؤوس سبورية بترتيب وتعقيد مختلفين . ان القاء نظرة سريعة على المظهر العام للرأس السبوري غالبا ما يكون كافيا لتشخيص الجنس . ولبعض الاعفان كونيديات بشكل سلاسل تشق طريقها بالضغط الواحدة بعد الاخرى من خلية خاصة تدعى الذنيب Sterigma (جمعها Sterigmata) او Phialide . عند قمة الحامل الكونيدي . ولبعض الاعفان الاخرى كتل من الكونيديات هي قطع من قمة الحامل الكونيدي وبدون ذنيبات واضحة . وقد تكون هذه الكتل من الكونيدات حرة أو ملتصقة بقوة . وقد تتبرعم كونيديات بعض الاعفان من الحامل الكونيدي وتستمر في التكاثر بواسطة التبرعم وتبدو بهيئة شبيهة بالخمائر .

أما الاعفان التي يمكنها انتاج سبورات جنسية Sexual spores فانهـا تقسم على اساس طريقة تكوين هذه السبورات وترعيسا • فالاعفان غيـر المقسمة (الفطريات الطحلبية Phycomycetes) التي تنتج سبورات بيضية Oospores يطلق عليها الفطريات البيضية Oomycetes. • ومعظم هذه الاعفان هي صـور مائية للفطريات • وتتكون هذه السبورات البيضية من اتحاد مشيج ذكري صغير مع مشيج انثوي كبير • وتكون الفطريات اللاقحية Zygomycetes سـبورات لاقحية Zygospores بواسطة اتحـاد راسي اثنتين من الهيفات اللتين تبدوان متماثلتين وتاتيان من الميسليوم ذاته أو من ميسليا مختلفة • وتكون كلا السبورات البيضية والسبورات اللاقحية مغطاة بجدار متين • ويمكنها البقاء لفتـرة طويلة في الجفـاف • وتكـون الفطريات الكيسـية Ascomycetes (وهي فطـريات مقسمة) سبورات جنسية تعرف بالسبورات الكيسية ascospores اذ تتكون بعد فترة من اتحاد خليتين من الميسليوم ذاته أو من ميسليا منفصلة • والسبورات الكيسية الناتجة عن انقسام الخلية بعد التزاوج تكون موجودة في كيس ascus يحتوي عادة على ثمانية سبورات • وقد تكون الاكياس مفردة أو بشكل مجاميع ضمن غلاف يدعى بالثمرة الكيسية ascocarp، الذي يتكون بواسـطة تفـرع وتظفر الهيفات المتجـاورة • وتكـون الفطريات البازيدية Basidiomycetes التي تضم معظم العرهونات mushrooms واصـداء النبـات والتفحمات وغيرها نوعا رابعا من السبورات الجنسية هي السبورات البازيدية basidiospores. •

2.2.3. الصفات الفسيولوجية –

* من الناحية الفسيولوجية ، تكون الاعفان اكثر قدرة على التكيف مع الظروف البيئية القاسية مقارنة بالاحياء المجهرية الاخرى • وعلى سبيل المثال ، تستطيع الاعفان النمو على مواد تحتوي على تراكيز من السكر لا تتمكن البكتريا من تحملها وذلك لكون الاعفان غير حساسة مثل البكتريا للضغوط الازموزية العالية • وتستطيع الاعفان ان تتحمل وتنمو في تراكيز عالية نسـبيا من الحامض • ان مدى اس هيدروجيني (pH) بين 2.0—9.0 يمكن تحمله ، الا ان الاس الهيدروجيني المثالي لمعظم الانواع هو 5.6 •

بالرغم من أن الماء ضروري لنمو الاعفان فضلا عن امكانية الحصول عليه من الجو ومن الوسط الغذائي ، فان الاعفان يمكنها البقاء في البيئات الجافة التي تعد مثبطة لمعظم البكتريا غير تلك المكونة للسبورات • وعندما تصبح البيئة جافة ، تنتج الاعفان سبورات أو تدخل في طور راحة •

ان معظم الاعفان هوائية بشكل تام ، وعليه فان نموها يتعزز بوجود امداد غزير من الاوكسجين • كما تنمو الاعفان على مدى واسع من درجات الحرارة الا ان الحرارة المثلى لمعظم الانواع تقع بين 22—30 م • وتنمو بعض الاعفان على درجة الصفر المئوي مسببة تلف اللحوم والخضراوات في مخازن التبريد • وهناك أعفان أخرى محبة للحرارة العالية تنمو على درجات حرارة تصل الى 62 م • كما ان بعض الانواع المكونة للكتل الصلبة تكون اكثر مقاومة للحرارة •

ويعد الجلوكوز مصدرا كربونيا مناسبا لمعظم الاعفان ، الا ان سكريات أخرى وخصوصا السكروز والمالتوز فضلا عن العديد من المركبات الكربونية العضوية الاكثر تعقيدا كالنشا والسليلوز تستخدم من قبل العديد من الانواع • وقد يفيد النتروجين اللاعضوي في صورة أملاح الامونيوم أو النترات كمصدر للنتروجين لبعض الانواع ، غير ان البعض يحتاج الى المواد النتروجينية العضوية التي تستفيد منها جميع الانواع على حد سواء وتحتاج الاعفان الى وجود بعض العناصر المعدنية والفيتامينات لنموها •

وللاعفان القدرة على تمثيل عدد واسع من المواد الغذائية والاستفادة منها ، كما انها كفوءة بدرجة كبيرة في تحويل المغذيات الى مادة خلوية ونواتج تمثيل أخرى • لذلك قد تستخدم مثل هذه الاعفان في بعض التخمرات الصناعية لانتاج مواد مهمة كالكحولات والاحماض العضوية وبعض المضادات الحيوية والانزيمات وغيرها •

3.3 الاعفان المهمة صناعيا ـ

هناك اعفان كثيرة ذات أهمية صناعية الا اننا سنعطي امثلة على بعض منها المستخدمة في التخمرات الصناعية على أن لا ندخل في تفاصيل الانتاج التي سيرد ذكرها فيما بعد • ومن هذه الاعفان المهمة بعض أفراد جنسي **Mucor** و **Rhizopus**

العـائدين الى الفطريات الزيجيـة وكذلك بعض أفـراد جنسي Aspergillus و Penicillium العائدين الى الفطريات الناقصة ٠

4. الخمائر والفطريات الشبيهة بالخمائر Yeasts and Yeast like Fungi

كما هو الحال مع العفن فان الاصطلاح (خميرة) شائع الاستخدام ولكنـه صعب التعريف ٠ وهذا الاصطلاح سيستخدم للاشارة الى تلك الفطريات الكيسية Ascomycetes التي تكون بصورة عامة غير خيطية ولكنها احادية الخلية بيضوية او كروية ٠

وقد تكون الخمائر مفيدة أو ضارة لنواح عديدة في حياة الانسان واقتصادياته وتدخل التخمرات المستخدم فيها الخميرة في صناعة الاغذية مثـل الخبـز والبيرة والانبذة والمشروبات الكحولية الاخرى والخل وفي انضاج الجبن ، كما قد تنمى الخميرة لانتاج الانزيمات أو قد تنمى لاستخدامها كغذاء للانسان أو الحيوان ٠ وتعد الخمائر ضارة وغير مرغوبة عندما تسبب تلف اغذية الانسان مثل المخللات وعصائر الفاكهة والعصائر السكرية المركـزة كالشراب والمولاس وعسـل النحل والمربيات فضلا عن الانبذة والبيرة واللحوم واغذية أخرى ٠

1.4. تقسيم الخمائر والتعرف عليها -

كان تقسيم الخمائر في السابق غير منتظم بسبب اعتماده بالدرجة الاساس على الصفات المورفولوجية التي قد تتباين في النوع الواحد في بيئات مختلفة ٠ والنظام الاكثر دقة في تقسيم الخمائر يقوم على صفات العملية الجنسية للتكاثر فضلا عن التخمر واستغلال الكربوهيدرات ٠ فالعائلة Saccharomycetaceae تضم جميع الخمائر المكونة للسبورات الكيسية الحقيقية ascoporogenous. (او الخمائر الجنسية) ٠ أما الخمائر اللاجنسية فانها لا تكون سبورات كيسـية asporogenous. وتعود الى احدى العائلات الاخرى Cryptococcaceae او Rhodotorulaceae او Sporobolomycetaceae. ٠

ان تقسيم الخمائر يخضع للتغير باستمرار ، اذ يتم توضيح أنواع جديدة وتوضـع صـفات جـديدة في كتب التصـنيف المرجعيـة ٠ ان تقسـيم العـائلة Saccharomycetaceae أو الخمـــائر المكـــونة للســـبورات الكيســية

ascosporogenous yeasts وكذلك تقسيم العائلة Cryptococcaceae
او الخمائر غير المكونة للسبورات asporogenous yeasts معرضان للتغير كلما أحرزت معلومات مورفولوجية وفسيولوجية جديدة تتعلق بهذه الاحياء ٠

ان المعايير المستخدمة في تقسيم الخمائر ، حيثما امكن باستخدام الطرق القياسية هي :ـ

1. التكاثر الخضري :

أ) التبرعم budding

ب) الانشطار البسيط fission

ان هذين المعيارين استخدما بكثرة لسنوات عديدة في تصنيف الخمائر ، ولكن بعض العلماء يعتقدون بانها أقل أهمية من بعض المعايير الاخرى ٠

2. التكاثر الجنسي :

أ) طريقة تكوين الاكياس السبورية وشكلها ٠

ب) عدد وشكل ولون السبورات في الاكياس ٠

جـ) كيفية انبات السبورات ٠

الا ان العوامل المتحكمة في تكوين السبورات الكيسية غير معروفة جيدا ٠

3. التخمر والتمثيل :

وفيما يلي بعض المعايير المستخدمة في تقسيم الخمائر :

أ) القدرة على تخمير سكريات معينة ٠

ب) معدل التخمر ٠

جـ) تمثيل مركبات كربونية معينة ٠

د) تمثيل مركبات نتروجينية محددة ٠

هـ) معايير فسيولوجية وكيموحيوية أخرى منها :

(1) مدى درجات الحرارة لاجل النمو ٠

(2) الاحتياجات الى الفيتامينات ٠

(3) تحمل كلوريد الصوديوم ٠

(4) اسالة الجيلاتين ٠

(5) التحلل المائي للدهن ٠

(6) وغيرها من التي لم توضع لها طرق اختبار روتينية ، وتتضمن التركيب الكيمياوي لجدار الخلية ، والمركبات المفرزة خارج الخلية ، والخواص الانتيجينية (المولدة للمضادات) للخلية ، ومحتوى الـ DNA من القواعد النتروجينية الجوانين والسايتوسين ٠

4. مورفولوجية المستعمرات وخواصها كما هو الحال في تقسيم البكتريا وتشمل اللون والقوام وطوبوجرافية السطح والمظهر الخارجي للمستعمرات ٠

والان نعود الى تقسيم الخمائر وتشخيصها ، فالخمائر الحقيقية true yeasts تقع في ما تحت القسم Ascomycotina في حين تقع الخمائر الكاذبة false yeast او الخمائر غير المكونة للسبورات في ما تحت القسم Deuteromycotina, او الفطريات الناقصة Fungi Imperfecti. ٠ وتكون الخمائر المسماة ballistosporogenous yeasts سبورات بالستية ballistospores ولكن ليس خلايا تبرعمية ٠ وقد حصرت هذه العائلة Sporobolomycetaceae في الفطريات البازيدية وذلك لان السبورات تتحرر بواسطة طريقة الافراز الساقط مثل السبورات البازيدية ، ومع ذلك لم تلاحظ أية دورة جنسية في الخمائر المكونة للسبورات البالستية ٠ والشكل(5.1)يوضح التقسيم المبدئي للخمائر مع بعض اهم الاجناس ٠

2.4 الصفات العامة للخمائر -

كما ذكرنا ان الخمائر تقسم تبعا لصفاتها المورفولوجية رغم كون الصفات الفسيولوجية مهمة بالنسبة للمتخصص في ميكروبيولوجي الغذاء والميكروبيولوجي الصناعي ٠

1.2.4 الصفات المورفولوجية -

تتحدد الصفات المورفولوجية للخمائر بواسطة الفحص المجهري ٠ وبصورة عامة فان الخمائر هي احياء وحيدة الخلايا في عدد متنوع من الاشكال تتفاوت من الكروي الى البيضوي الى الاهليجي ومن الاسطواني الى المتطاول وحتى الخيطي ٠ وقد يكون

شكل الخلية مثلثا أو قد يتطاول ليصبح ميسليوما كاذبا أو حقيقيا . ويوضح الشكل (6.1) الاشكال المختلفة من الخمائر .

I. The ascosporogenous yeasts

SUBDIVISION *Ascomycotina*

CLASS *Hemiascomycetes*

ORDER *Endomycetales*

FAMILY *Saccharomycetaceae, Spermophthoraceae*, and *Endomycetaceae*

SUBFAMILY *Schizosaccharomycoideae*[1,5] *Saccharomycoideae*[3] *Lipomycetoideae*[2] *Nadsonioideae*[1]

GENUS
- *Schizosaccharomyces*[1,5]
- *Endomycopsis*[3,5], *Hansenula*[3,4,5], *Pichia*[3,4], *Debaryomyces*[3,4], *Saccharomyces*[1], *Kluyveromyces*[1]
- *Lipomyces*[2]
- *Nadsonia*[1,6], *Saccharomycodes*[1,6], *Hanseniaspora*[1]

II. The ballistosporogenous yeast (asexual yeast — do not form ascospores)

SUBDIVISION *Deuteromycotina*

CLASS *Blastomycetes*

FAMILY *Sporobolomycetaceae*

GENUS *Sporobolomyces*

III. Yeast that do not form ascospores or ballistospores (the asporogenous yeasts or *Fungi Imperfecti*)

SUBDIVISION *Deuteromycotina*

CLASS *Blastomycetes*

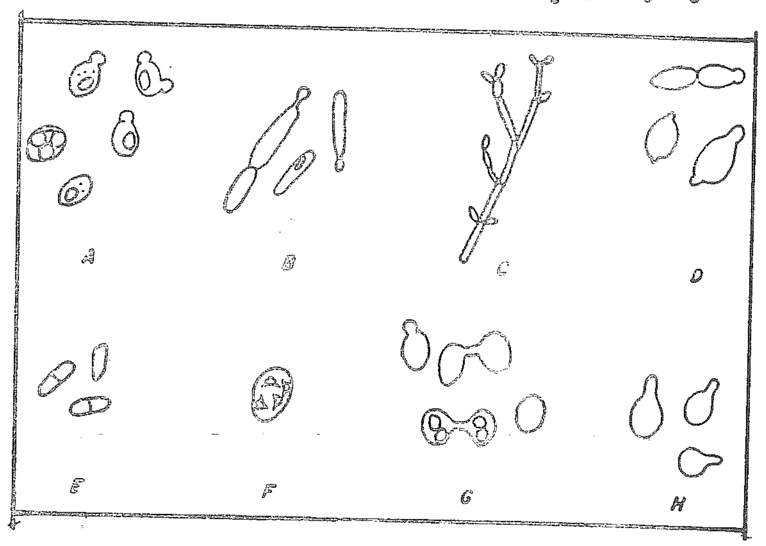
FAMILY *Cryptococcaceae*

GENUS
Cryptococcus[2]
Torulopsis[1]
Pityrosporum[2]
Brettanomyces[1,5]
Candida[1,4,6]
Kloeckera[1,6]
Trichosporon[4]
Rhodotorula

الشكل (5.1) . التقسيم المبدئي للخمائر مع بعض أهم الاجناس .

1 موجبة التخمر . 2 سالبة التخمر . 3 موجبة أو سالبة التخمر .
4 قد تكون غشاءا رقيقا . 5 الميسليوم حقيقي أو كاذب . 6 ذات شكل ليموني (Apiculate) .

وتختلف الخمائر في الحجم ، وعموما تكون خلايا الخميرة اكبر من معظم البكتيريات ولكن اصغر الخمائر ليست كبيرة لدرجة تفوق في حجمها اكبر بكتريا ، وتتفاوت ابعاد خلية الخميرة بين 1—3 ميكروميتر في العرض و 5—30 ميكروميتر في الطول ، ويختلف حجم وشكل الخميرة تبعا للعمر والظروف البيئية ، ولا تمتلك الخمائر اسواطا أو اي اعضاء حركة ،



الشكل (6.1). الاشكال المختلفة من الخمائر ،

حيث :(A) خميرة Saccharomyces cerevisiae مع خلايا متبرعمة وكيس واحد فيه اربعة سبورات كيسية ،

(B) خميرة ال Candida ذات الخلايا الطويلة ،

(C) خميرة ال Candida ويظهر فيها المسليوم الكاذب ،

(D) خميرة Apiculate (ذات الشكل الليموني) ،

(E) خميرة Schizosaccharomyces المتكاثرة بواسطة الانشطار البسيط ،

(F) خميرة Zygosaccharomyces ويظهر فيها الاندماج بين كيسين كما تظهر اربعة سبورات كيسية ،

(G) الخميرة ذات الشكل الدورقي ،

ومن الاجزاء المرئية عند الفحص المجهري لخلايا الخميرة هي الجدار الخلوي ، والسايتوبلازم ، وفجوات مائية ، وكريات دهنية صغيرة ، وحبيبات تخزين دقيقة قد تكون متغيرة اللون أو زلالية او نشوية . وتتطلب مشاهدة النواة تصبيغا خاصا .

2.2.4 تكاثر الخمائر –

تتكاثر الخمائر بالطرق التالية :

(أ) طريقة التبرعم Budding –

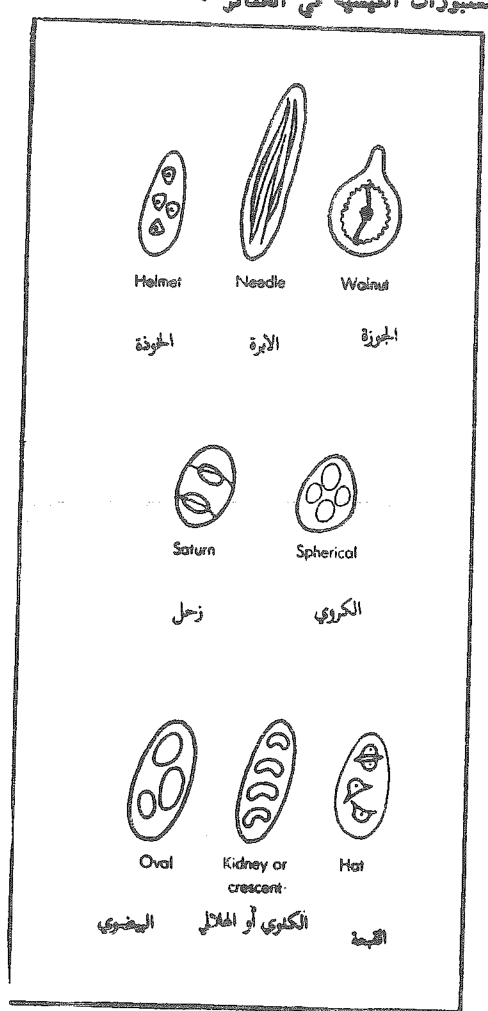
وتعد هذه الطريقة من اكثر الطرق شيوعا في تكاثر الخمائر خضريا (لا جنسيا) . وفي هذه الطريقة اللا جنسية يمتد انبوب من الفجوة النووية للخلية الام باتجاه أقرب نقطة الى الفجوة . ويتكون نتوء صغير على السطح الخارجي للخلية ، ومن ثم يمر الانبوب خلال الجدار الخلوي الى النتوء الذي يكبر ويصبح ممتلئا بالمادة النووية والساتيوبلازمية من الخلية الام . وعندما يصبح البرعم كبيرا يعاد توجيه الجهاز النووي في كلا الخليتين بحيث تصبح الكرية المركزية Centrosome في كل خلية بعيدة عن نقطة الاتصال ، وعند ذاك تنفصل الخلية الجديدة عن الخلية الام وتتكرر العملية لتكوين براعم جديدة .

(ب) التكاثر بتكوين السبورات Sporulation –

تكون جميع الخمائر الحقيقية سبورات كيسية بعملية جنسية ، ولهذا السبب فقد وضعت الخمائر الحقيقية في مجموعة الفطريات الكيسية Ascomycetes . وعادة يحتوي الكيس من سبور واحد الى اربعة سبورات ولكن العدد قد يكون ثمانية أو أكثر . ويتكون السبور بواسطة الانقسام المتكرر للنواة ، وكل نواة متكونة تحاط بمادة ساتيوبلازمية ومن ثم بواسطة جدار خلوي .

وقد يحدث تزاوج في التكاثر الجنسي للخمائر مباشرة قبل تكوين السبور أو مباشرة بعد انباته . وقد تكون هذه السبورات متماثلة الامشاج isogamic عندما تتزاوج نوى خليتين متماثلتي الحجم والشكل ، أو مختلفة الامشاج heterogamic عندما تتزاوج نوى خليتين غير متماثلتي الحجم والشكل . وتنقسم النوى المتزاوجة مرة أو عدة مرات وبالتالي يتكون السبور الكيسي . ويتباين عدد

ما يشاهد اكثر من 8 سبورات ، غير ان كيس الخميرة Lipomyces قد يحتوي على 16 سبور كيسي • ويعد شكل السبور كيسي صفة هامة ويختلف من الكروي والبيضوي والشكل الهلالي والشكل القبعي الى صور أخرى • ويوضح الشكل (7.1) الهيئات المختلفة للسبورات الكيسية في الخمائر •



الشكل (7.1) • الهيئات المختلفة للسبورات الكيسية في الخمائر

ان بعض أنواع عائلة Saccharomycetaceae تكون سبورات كيسية بسهولة بصرف النظر عن البيئة ، في حين يتطلب البعض الاخر النمو على بيئات خاصة مع التحكم الدقيق بالظروف المزرعية • وقد تفقد بعض الخمائر قدرتها على تكوين السبورات بعد حفظها تحت ظروف المختبر لفترات طويلة نسبيا •

ويترافق تكوين السبورات اللا جنسية أو الخضرية في الفطريات الكيسية مع انتاج الكونيديات •

وتعود الخمائر الكاذبة أو الناقصة التي لا تكون سبورات كيسية او اية سبورات جنسية أخرى الى الفطريات الناقصة Fungi Imperfecti وعليه فانه تدعى بالخمائر غير المكونة للسبورات وتقع ضمن عائلة Crytocoocaceae ويكون تكاثرها اما بالتبرعم أو بواسطة السبورات المفصلية Arthrospores كما في بعض السلالات • وقد تكون خلايا بعض الخمائر سبورات كلاميدية Chlamydospores وذلك بواسطة تكوين جدر خلوية سميكة حول الخلايا ، وهذه السبورات تقاوم الجفاف أكثر من الخلايا الخضرية وعندما تتوفر الظروف الملائمة فانها تنبت مكونة خلية خضرية واحدة جديدة بدون تكاثر •

(جـ) التكاثر بالانشطار الثنائي Binary fission -

وتعد هذه من طرق التكاثر اللا جنسي أو الخضري ، وهي تماثل طريقة تكاثر البكتريا • وفي هذه الطريقة تنتفخ خلية الخميرة أو تستطيل وتنقسم النواة وبذلك تتكون خليتان جديدتان كل منهما تحتوي على نواة وسايتوبلازم كما هو الحال مع خميرة Schizosaccharomyces •

(د) التكاثر بانشطار البرعم Bud fission -

وهذه الطريقة تجمع بين التكاثر بالتبرعم والتكاثر بالانشطار الثنائي الموضحين سابقا • وفي هذه الطريقة التي تحدث في جنسي الخميرة Saccharomycodes و Nadsonia تتكون براعم عند نهايات الخلايا ثم يتكون جدار عرضي بين الخلية الام والخلية الابنة •

3.2.4 الصفات الفسيولوجية للخمائر :

بالرغم من أن أنواع الخمائر قد تختلف كثيرا في فسلجتها ، الا أن الخمائر ذات الاهمية الصناعية لها من الصفات الفسيولوجية العامة ما يسمح بتعميم ذلك ، مع الاخذ بنظر الاعتبار وجود بعض الاستثناءات ٠

ان معظم الخمائر المألوفة تنمو بصورة جيدة في وجود امداد وفير ومتيسر من الرطوبة ٠ اذ تنمو الخمائر في وجود تراكيز كبيرة من المذابات (كالسكر أو الملح) وهذا يشير الى انها تحتاج الى رطوبة أقل من غالبية البكتريا ٠ ومع ذلك تتطلب معظم الخمائر رطوبة أكثر مما تتطلبه الاعفان ٠ وعلى أساس النشاط المائي a_w اللازم للنمو ، يمكن القول بأن الخمائر تعد اعتيادية اذ نمت في بيئات ذات تراكيز واطئة من المذابات أي في نشاط مائي a_w عال ٠

ان اقل مستو من a_w للخمائر الاعتيادية المختبرة يتفاوت بين 0.88 — 0.98. والامثلة المحددة لاقل a_w هي 0.94 لخميرة البيرة و 0.90 للخميرة المعزولة من الحليب المكثف و 0.905 لخميرة الخباز ٠ وفي المقابل فان الخمائر المحبة للضغط الازموزي Osmophilic yeasts تنمو ببطء في بيئات لها نشاط مائي a_w واطيء بقدر 0.62 — 0.65 كما هو الحال في الشراب المركز ، بالرغم من أن بعض الخمائر المحبة للضغط الازموزي قد اوقفت عند نشاط مائي قدره 0.78 تقريبا في كلا المحاليل المركزة الملحية والسكرية ٠ ولكل خميرة نشاطها المائي الامثل a_w ومدى من النشاط المائي للنمو تحت ظروف بيئية معينة ٠ اذ تختلف قيم a_w مع الخواص التغذوية للمواد المغذية وال pH ودرجة الحرارة وتيسر الاوكسجين ووجود أو غياب المواد المثبطة ٠

وبصورة عامة يكون مدى درجات الحرارة لنمو معظم الخمائر مماثلا للمدى الذي تنمو فيه الاعفان ، وتتفاوت الدرجات المثلى بين 25 — 30 م والقصوى بين 35 — 47 م ٠ ولبعض الانواع القدرة على النمو عند درجات الصفر المئوي أو اقل منه ٠

وتفضل معظم الخمائر وسطا حامضيا لنموها ويتفاوت المدى الامثل بين pH 4.0 — 4.5 ولكنها لا تنمو في الاوساط القلوية ما لم يتم تطبيعها على ذلك ٠

وبصورة عامة تمد السكريات أفضل غذاء للخمائر من أجل الطاقة ، رغم ان الخمائر التاكسدية مثل الخمائر الغشائية تؤكسد الاحماض العضوية والكحول . وقد يحدث هدم السكريات كالجلوكوز لا هوائيا (تخمر) أو هوائيا (تنفس) . الا ان العملية النموذجية هي الهدم اللاهوائي الذي يعرف بالتخمر الكحولي حيث ان النواتج النهائية هي الكحول الاثيلي وثاني اوكسيد الكربون :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$$

ويحدث هذا التخمر عن طريق دورة التحلل الجلايكولي التي سيتم توضيحها فيما بعد . وتحت الظروف اللاهوائية ، يتضمن الهدم استغلال الاوكسجين الجوي بعدة مسارات . في عملية التنفس ، تعطي الاكسدة التامة للجلوكوز ثاني اوكسيد الكربون والماء ، بينما تترافق الاكسدة غير التامة مع تراكم الاحماض والنواتج الوسطية الاخرى . ومن احدى المسارات الرئيسة هي دورة حامض ثلاثي الكربوكسيل وسيتم توضيح الاهمية الفسيولوجية للاكسدة اللاهوائية والهوائية في صيغ طاقية وبشيء من التفصيل فيما بعد .

ان الذي يهمنا في هذا المجال هو بعض المنتجات المهمة التي يتحصل عليها من العملية التخمرية مثل الكحولات والاحماض والاسترات والجليسرول والالدهيدات .

ان العملية التخمرية هي لا هوائية اساسا ، واذا تمت تهوية المزارع خلال النمو فان التخمر يتوقف في صالح المسارات التاكسيدية . وقبل ان تقوم الخميرة بتخمير السكريات الثنائية أو الثلاثية أو المتعددة ينبغي أولا تحللها مائيا بواسطة الانزيمات (انزيمات التحلل المائي هيدروليزات) . ونظرا لاختلاف أنواع الهيدروليزات المنتجة من قبل الخمائر تبعا للجنس أو النوع ، فان هذه الصفة قد استخدمت للتفرقة بين الانواع . وتمد الخمائر مصدرا غنيا بالانزيمات الاخرى مثل لاكتيز وانفرتيز وكتاليز المهمة تجاريا .

وبصورة مماثلة ، ففي العملية التنفسية هناك اختلافات في المركبات التي يمكن تمثيلها بواسطة انواع مختلفة من الخمائر . اذ يمكن لبعض الخمائر الاستفادة

من البنتوز(D — زايلوز ، D) — رايبوز) ، والسكريات المتعددة (النشا) ، والكحولات السكرية (مانيتول ، سوربيتول) ، والاحماض العضوية (لاكتيك ، حليك ، ستريك) ومركبات عضوية اخرى ٠

وتحصل الخمائر على النتروجين اللازم في ايضها لتخليق البروتين من المصادر العضوية واللاعضوية ، وتتمكن معظم الانواع من الاستفادة من ايون الامونيوم ٠ ان الاختلافات في قدرة الخمائر على استخدام النترات والنتريت وفي ازالة مجموعة الامين من الاحماض الامينية تساعد في التفرقة بين السلالات أو الانواع ٠

ويمكن ايفاء احتياجات الخمائر من الكبريت بواسطة تيسر الكبريتات في المواد المغذية ، الا ان بعض الخمائر تتشجع في وجود الكبريت العضوي مثل السستايين والميثيونين ٠ وتعد المعادن ضرورية لنمو الخمائر وهذه تشمل البوتاسيوم والمغنيسيوم والصوديوم والكالسيوم ٠ كما تحتاج الخمائر الى وجود بعض العناصر النادرة أو الضئيلة مثل البورون والنحاس والزنك والمنغنيز والحديد واليود والموليبدنوم لاعطاء أفضل حاصل في البيئة المخلقة ٠

5. البكتريا Bacteria

ان تصنيف وتشخيص البكتريا خارج عن نطاق هذا الكتاب ٠ وينبغي مراجعة الموضوع في الكتب المتخصصة بصورة أوسع وأشمل ، غير اننا سنذكر باختصار بعض الصفات المورفولوجية والفسيولوجية للبكتريا مع فكرة اولية عن تقسيمها ٠

بالرغم من وجود الاف الانواع من البكتريا فان الخلايا الفردية لها ثلاثة أشكال عامة هي : اهليجية أو كروية ، وأسطوانية أو عصوية ، وحلزونية أو لولبية ٠ علاوة على ذلك فان خلايا بعض الانواع البكترية تنظم نفسها في تجمعات مختلفة منها التجمعات المزدوجة أو العنقودية أو السبحية ٠

وعموما فان الخلية البكترية لا تختلف كثيرا من ناحية التركيب الخلوي عن خلايا الكائنات الحية الوحيدة الخلية ٠ ولما كانت الخلية البكترية صغيرة جدا فان البعض يمكن رؤيته مجهريا بعد معاملته معاملة خاصة ، وذلك باستخدام الاصباغ التفريقية الخاصة للتعرف على أجزاء الخلية المختلفة ، الامر الذي لا يتبع عند

الفحص بالمجهر الالكتروني الذي تستعمل فيه عينات جافة من خلايا غير مصبوغة ٠

وتعد البكتريا الحقيقية Eubacteria من أبسط البكتريا جميعا من حيث شكل خلاياها وتركيبها الظاهري ٠ فهي تشمل البكتريا غير الخيطية غير المخلقة ضوئيا والتي تتميز خلاياها بجدرها الخلوية الصلبة ٠ ولا يزيد قطرها من 2—3 ميكروميتر ويتحرك بعضها حركة دورية او لولبية في حين يتحرك البعض الاخر حركة زحوية ٠ وتمتلك معظم البكتريات المتحركة اعضاء حركة دقيقة تدعى الاسواط flagella أو تركيبات خيطية قصيرة تدعى Fibrils ٠ ونادرا ما يشاهد تزاوج جنسي في البكتريا ، ويكون الانقسام النووي بواسطة الانشطار وليس بواسطة الانقسام العادي Mitosis كما لا تكون مادتها النووية مغلفة بغشاء نووي ٠

ومن الناحية الاخرى ، هناك بكتريا أخرى غير البكتريا الحقيقية مثل بكتريا Pleuropneumonia التي تكون أجساما ثمرية بحيث ان بعضها يرى بالعين المجردة ٠ وبعض منها يشبه البروتوزوا مثل Spirochetes والبعض الاخر يشبه الاعفان مثل الاكتينوميسيتات Actinomycetes واخريات تشبه الطحالب مثل Beggiatoa ٠ وهذه المجاميع المختلفة في صفاتها المورفولوجية والفسيولوجية والبيئية لها صفات الخلايا البدائية النواة Procaryotic cells اي ليس هناك غشاء يحيط بالمادة النووية مما ادى الى وضعها في مملكة بدائيات النواة Procaryotae ٠

1.5 الصفات المورفولوجية :ـ

يعد الفحص المجهري اول خطوة في تشخيص البكتريا والتعرف عليها وذلك لمعرفة شكلها وحجمها وتجمعاتها وتركيبها وتفاعلات تصبيغها ٠ وفيما يلي بعض هذه السمات ذات الاهمية الخاصة :

1.1.5 تكوين الاغلفة اللزجة Encapsulation —

يحاط الجدار الخلوي أحيانا بغلاف لزج Capsule يساعدها في مقاومة الظروف البيئية القاسية مثل الحرارة والمواد الكيمياوية ٠ ويتكون هذا الغلاف من سكريات متعددة كالديكسترين والديكستران والليفان ٠

2.1.5 تكوين السبورات الداخلية Endospores –

تشــــترك البكتــــريا من اجنــــاس Bacillus و Clostridium, و Desulfotomaculum و Sporolactobacillus, (عصــــــويات) و Sporosarcina (كرويات) في القدرة على تكوين سبورات داخلية مقاومة للحرارة والاشعة فوق البنفسجية والتجفيف • وعند تحلل الخلايا الخضرية تنطلق هذه السبورات التي تبقى في حالة سكون وبدون اي نشاط ايضي ملحوظ لمــدة سنوات •

وعادة تظهر عملية تكوين السبورات في طور النمــو اللوغاريتمي المتأخــر بسبب نضوب المواد الغذائية أو تكدس النواتج • وخلال هذا التحول من الخليــة الخضرية الى السبور ، يصبح السبور اكثر قدرة على كسر الضوء Refractile ويحــدث امتصاص كبير لايــونات الكالسيوم وتخليــق لحامض داي بيكولينيك Dipicolinic acid (DPA) وهو المقد الذي تفتقده الخليــة الخضرية • ان اكتساب السبور المتكون للمقاومة الحرارية ينسب الى تكوين DPA وامتصاص ايونات الكالسيوم •

ويشجع الانبات بواسطة الظروف التي تكون مناسبة لنمو الخلايا الخضريــة ولكنه قد يحدث تحت الظروف التي لا تسمح بمثل هذا النمو كدرجات حــرارة منخفضـة • وقد يحــدث بواســطة خليــط من الاحمــاض الامينية ، وبايونات Mg^{2+} و Mn^{2+} ، وبالجلــوكوز ، وبحامض داي بيكــولينيك مــع ايــونات الكالسيوم ، وبالصدمة الحرارية أو التنشيط الحراري ، الذي ينشط الانزيمات الساكنة • وتعتمد درجة الحرارة المثلى وكذلك المدة الزمنية للصدمة الحــرارية على نوع السبور ، فالمعاملة الحرارية تكــون أعظم في سبورات البكتريا المحبــة للحرارة العالية Thermophiles من تلك المستخدمة في سبورات البكتريا المحبة للحرارة المتوسطة Mesophiles • ويتثبط الانبات بواسطة حامض السوربيك فــي وســط حامضي ، والكاتيونات الثنــائية ، والنشــا ، وحامض الاوليــك واللينولييك •

وتعرف حالة سكون Dormancy السـبورات بانهــا الانبــات المتاخــر تحت الظروف المشجعة لها • ومع ذلك قد تفشل السبورات في الانبات ومن المحتمل ان

يكون السبب هو الظروف غير المناسبة كالمثبطات في البيئة أو النقص في المغذيات الاساسية مثل الاحماض الامينية • وقد تثبت بعض الصورات ولكنها تفشل في النمو وقد يكون بعضها قد تلف بالحرارة أو الاشعاعات أو العوامل الاخرى لذلك فهي تحتاج الى بيئة أكثر تعقيدا أو تخصصا للنمو من سابقتها •

2.1.5 تكوين التكتلات الخلوية Cell Aggregates —

لبعض أنواع البكتريا خاصية تكوين سلاسل طويلة والبعض الاخر خاصية تكوين تكتلات تحت ظروف معينة • وبصورة عامة يصعب قتل جميع البكتريا الموجودة في سلاسل مظفرة أو في تكتلات كبيرة ويسهل قتلها عندما تكون في حالة خلايا مفردة •

2.5 الصفات الفسيولوجية :—

أكثر ما يهم المتخصصين في علم الاحياء المجهرية عند دراستهم للبكتريا طريقة نموها ونشاطها في الاوساط الغذائية والتغيرات التي تحدثها • وتشمل هذه التغيرات التحلل المائي للكربوهيدرات المعقدة الى مواد بسيطة ، والتحلل المائي للبروتينات الى الببتيدات المتعددة والاحماض الامينية والامونيا أو الامينات ، والتحلل المائي للدهون الى الجليسرول والاحماض الدهنية • وتستفيد البكتريا من تفاعلات الاكسدة والاختزال في الحصول على الطاقة من المواد الغذائية (الكربوهيدرات ومركبات كربونية أخرى ومركبات الكربون — النتروجين البسيطة وغيرها) لتعطي منتجات مثل الاحماض العضوية والكحولات والالدهيدات والكيتونات والغازات •

2.5 تكاثر البكتريا :—

ان نمو وانقسام الخلايا البكترية يمثل عملية دورية فشكل خلية جديدة تتكون ، تصبح ذات قدرة على التكاثر بمعنى أن الخلايا الجديدة الناتجة عن الانقسام تمتلك الخصائص الفسيولوجية التي كانت تميز آباءها القادرة على التكاثر •

وقد أظهرت الدراسات ان نمو الخلايا قبل الانقسام يؤدي الى زيادة في طولها

ومع الزيادة في كمية السايتوبلازم تتكون بالخلية المقدمة على الانقسام كمية من المحتويات النووية تكفي لخليتين • وعقب زيادة الخلايا المقبلة على الانشطار Fission في الحجم تبدأ في الانقسام الى خليتين ، حيث تنقسم نتيجة لنمو حاجز عرضي يتكون من مادة الجدار الخلوي ناشئا من منطقته وممتدا بداخل الخلية حتى يفصلها الى خليتين وان الجدار المتكون لا يلبث ان يزدوج ليسهل انفصال الخلايا الجديدة المتكونة •

وهناك بعض البكتريا تتكاثر بطريقة التبرعم الحقيقي Budding التي تميز تكاثر الخمائر ، في حين تتكاثر بعض المجاميع البكتيرية بواسطة تجزؤ خيوطها طوليا الى وحدات صغيرة جدا والتي بنموها تعطي نموا خيطيا طبيعيا من جديد كما في الاكتينوميستيات •

وقد كان يعتقد الى عهد غير بعيد ان الانشطار الثنائي Binary fission هو الطريق الوحيد لتكاثر البكتريا اذ لم تشاهد حينئذ قدرة البكتريا على التكاثر الجنسي • وقد امكن حديثا اثبات حدوث التكاثر الجنسي في البكتريا وذلك عن طريق مشاهدة انتقال صفات الاباء الى الاجيال المتعاقبة • ويشترط لاظهار هذا الانتقال في الصفات الوراثية استعمال آباء مختلفة في واحد أو أكثر من الصفات الثابتة • ونظرا لكون هذا الموضوع خارج نطاق الكتاب الحالي فاننا ننصح القاريء بالعودة الى المراجع المتخصصة به لمزيد من المعلومات والتفاصيل •

4.5. تقسيم البكتريا :-

وكما ذكرنا لن ندخل في تقسيم البكتريا بشكل تفصيلي ولكننا سنلقي نظرة عامة على التقسيم الحديث للبكتريا • من الانسب تنظيم تقسيم البكتريا في نظام مرتب تسلسليا للنوع التقليدي • وبصرف النظر عن خاصية المشاطرة الاساسية لتنظيم الخلايا البدائية النواة فان البكتريا هي مجموعة ذات اختلاف كبير جدا ، وان أحدها لا يمكن ان يرتبط بالاخر من النواحي التركيبية والوظيفية • وعليه لم تنجح اية محاولة من المحاولات لتطوير تقسيم مرتب تسلسليا وبشكل كامل لهذه الاحياء • وفي الطبعات المتعاقبة من المرجع التقسيمي المعروف Bergey's Manual الذي يعد المبحث الرئيس عن تصنيف البكتريا منذ طبعته في عام 1923 ، تنير

تركيب وترتيب المجموعات التصنيفية الاعلى (الرتب Orders والعائلات Families والفصائل Tribes) بشكل جوهري في كل طبعة لاحقة • وفي آخر طبعة لهذا المرجع (الطبعة الثامنة لعام 1974) تم تبني طريقة تجريبية بدرجة اكبر • اذ قسمت البكتريات الى 19 قسما Parts ، كل منها قابل للتمييز بواسطة عدد بسيط من المعايير السهلة التحديد وكل منها يحمل اسما دارجا • والاجناس في بعض الاقسام موضحة ببساطة في ترتيب اعتباطي ، في حين جمعت هذه الاجناس في اقسام أخرى في عائلات واحيانا في رتب • وهذا الترتيب هو في الواقع ترتيب تسلسلي جزئي • ومن الصعوبات العرضية التي تنشأ عن هذا الترتيب التسلسلي بين البكتيريات هو أن اقساما عديدة جمعت فيها الاجناس في عائلات ، تضم أيضا ملاحق معنونة باسم أجناس غير محددة النسب أو الاصل Genera of Uncertain Affilation ومتالفة من أجناس لا يمكن ان تناسب الترتيب التسلسلي المحدد والمستخدم في التقسيم •

وبقدر ما هو هدف Bergey's Manual تسهيل التعرف على البكتريا ، فانه يعني بقدر قليل كيفية ترتيب الاجناس المكونة ، بشرط تيسر نظام تعرف وتشخيص كفؤ لتحديد موقع جنس كائن مجهول • ان المفتاح المتعدد المفصل لهذا الغرض موجود في الطبعة الثامنة لهذا المرجع التقسيمي والذي يعد من احد معالمه المميزة المهمة • وفيما يلي التنظيم العام المختار في الطبعة الاخيرة من Bergey's Manual :

Kingdom : Procaryotae — مملكة بدائيات النواة

Division I. Cyanobacteria (not further treated)

Division II. Bacteria — البكتريا

Part 1. Phototrophic Bacteria — البكتريا الممثلة للضوء

رتبة واحدة ، 3 عائلات ، 18 جنسا •

Part 2. Gliding Bacteria — البكتريا المنزلقة

رتبتان ، 8 عائلات ، 21 جنسا ، وايضا 6 أجناس غير محددة النسب •

Part 3. Sheathed Bacteria — البكتريا ذات الغلاف

7 أجناس •

Part 4. Budding and/or Appendaged Bacteria — البكتريا المتبرعمة والمذيلة

17 جنسا

Part 5. Spirochaetes

البكتريا الحلزونية

رتبة واحدة ، عائلة واحدة ، 5. أجناس .

Part 6. Spiral and Curved Bacteria.

البكتريا اللولبية والمتقوسة

عائلة واحدة ، جنسان ، وايضاً 4 أجناس غير محددة النسب .

Part 7. Gram-Negative Aerobic Rods and Cocci.

عصويات وكرويات هوائية سالبة للجرام .

5 عائلات ، 14 جنساً ، أيضاً 6 أجناس غير محددة النسب .

Part 8. Gram-Negative Facultatively Anaerobic Rods.

عصويات لاهوائية اختيار سالبة للجرام .

عائلتان ، 17 جنساً ، ايضاً 9 أجناس غير محددة النسب .

Part 9. Gram-Negative Anaerobic Bacteria.

بكتريا لاهوائية سالبة للجرام .

عائلة واحدة ، 3 أجناس ، أيضاً 6 أجناس غير محددة النسب .

Part 10. Gram-Negative Cocci and Coccobacilli.

كرويات وكرويات عصوية سالبة للجرام .

عائلة واحدة ، 4 أجناس ، أيضاً جنسان غير محددي النسب .

Part 11. Gram-Negative Anaerobic Cocci.

كرويات لاهوائية سالبة للجرام .

عائلة واحدة ، 3 أجناس .

Part 12. Gram-Negative Chemolithotrophic Bacteria.

عائلتان ، 17 جنساً .

Part 13. Methane-Producing Bacteria.

البكتريا المنتجة للميثان .

عائلة واحدة ، 3 أجناس .

Part 14. Gram-Positive Cocci

كرويات موجبة للجرام .

3 عائلات ، 12 جنساً .

Part 15. Endospore-Forming Rods and Cocci.

عصويات وكرويات مكونة للسبورات الداخلية .

عائلة واحدة ، 5 أجناس ، أيضاً جنس واحد غير محدد النسب .

Part 16 Gram-Positive Asporogenous Rod-Shaped Bacteria.

البكتريا ذات الشكل العصوي غير المكونة للسبورات الموجبة للجرام .

عائلة واحدة ، بجنس واحد ، أيضاً 3 أجناس غير محددة النسب .

Part 17. Actinomycetes and Related Organisms.

الاكتينوميسيتات والاحياء القريبة منها .

4 أجناس لم تعز الى عائلة ، عائلة واحدة مع جنسين ، رتبة واحدة مع 8 عائلات و 31 جنساً .

Part 18. Rickettsias.

الريكتسيات .

رتبتان ، 4 عائلات ، 18 جنساً .

Part 19. Mycoplasmas.

صف واحد ، رتبة واحدة ، عائلتان ، جنسان ،

ايضا جنسان غير محددي النسب .

5.5 المجموعات البكتيرية المهمة في مايكروبيولوجي الاغذية والمايكروبيولوجي الصناعي :

غالبا ما تصنف البكتريا المهمة في الاغذية الى مجموعات على اساس الصفات المألوفة بغض النظر عن تقسيمها النظامي . ومن الواضح ان بعض الانواع البكتيرية قد تضم في اثنين او اكثر من هذه المجموعات المصطنعة ، والامثلة عليها ما يلي :

1.5.5 البكتريا المكونة لحامض اللاكتيك Lactic Acid-forming Bacteria, or Lactics

ان اهم صفات هذه البكتريا هو قدرتها على تخمير السكريات الى حامض اللاكتيك . وقد يكون ذلك مرغوبا في صناعة بعض المنتجات مثل السوركراوت او الجبن ولكنه يعد غير مرغوب به في صناعة النبيذ . وبسبب انتاجها للحامض بسرعة وعادة بمقادير كبيرة فانها تتخلص دائما من منافسة الاحياء المجهرية الاخرى . وتضم الاجناس الرئيسة اعضاء لعائلتي Lactobacillaceae و Streptococcaceae, وعمومها Leuconostoc و Lactobacillus و Streptococcus, و Pediococcus .

2.5.5 البكتريا المكونة لحامض الخليك Acetic Acid-forming Bacteria, or Acetics

تعود معظم بكتريا حامض الخليك الى احد جنسين : Acetobacter و Gluconobacter . ويؤكسد كلا الجنسان الكحول الاثيلي الى حامض الخليك ،

ولكن جنس Acetobacter قادر على الأكسدة الاضافية لحامض الخليك الى ثاني اوكسيد الكربون . ومن الصفات التي تميز بكتريا حامض الخليك مهمة هي الآتي :-

(1) قدرتها على أكسدة الايثانول الى حامض الخليك بحيث تستعمل تجاريا في صناعة الخل وضارة في صناعة المشروبات الكحولية .

(2) قدرتها القوية على الأكسدة مما تسبب في أكسدة ناتج مرغوب كاملا من الخليك بواسطة أنواع مرغوبة أو غير مرغوبة تحت ظروف معينة .

وقد تكون هذه القدرة على الأكسدة مفيدة كما في أكسدة D - سوربيتول الى L سوربوز الذي يدخل في صناعة حامض الاسكوربيك بالطرق الصناعية .

(3) المقاومة العالية لبعض الانواع مثل Acetobacter aceti subsp. xylinum لحامض الخليك التي تحدث في صناعة الخل .

5.5.3 البكتريا المكونة لحامض البيوتريك Butyric Acid-forming Bacteria, or Butyrics -

معظم بكتريا هذه المجموعة لا هوائية مكونة للسبورات من الجنس Clostridium.

5.5.4 البكتريا المكونة لحامض البروبيونيك

— Propionic Acid-forming Bacteria, or Propionics .

تقع معظم بكتريا هذه المجموعة في الجنس Propionibacterium.

5.5.5 البكتريا المحللة للبروتين Proteolytic Bacteria —

يطلق لفظ هذه المجموعة الغير متجانسة الانواع من البكتريا المحللة للبروتين الأحادية والتي تنتج انزيمات البروتينيزات Proteinases خارج الخلايا هذه التسمية لأن الانزيمات تفرز الى خارج الخلايا . لجميع البكتريا بروتينيزات داخل الخلايا ولكن عددا محدودا منها فقط له بروتينيزات تفرز خارجيا . وقد تقسم البكتريا المحللة للبروتين الى مجموعة هوائية أو اختيارية وقد تكون مكونة أو غير مكونة للسبورات ، ومجموعة أخرى لا هوائية مكونة للسبورات . وتعتبر بكتريا Bacillus cereus هوائية مكونة للسبورات محللة للبروتين ، والبكتريا Pseudomonas fluorescens غير مكونة للسبورات وهوائية الى اختيارية . والبكتريا Clostridium sporogenes مكونة للسبورات ولا هوائية . ان السلالات من الأنواع Clostridium و Bacillus و Pseudomonas و Proteus هي محللة للبروتين . ويطلق على بعض البكتريا مصطلح محللة

للبروتين – حامضية Acid-proteolytic لكونها تجري تخمرا حامضيا وتحلل بروتينيا Proteolysis في وقت واحد فالبكتريا Streptococcus faecalis var. liquefaciens وكذلك البكتريا Micrococcus caseolyticus هي محللة للبروتين – حامضية • وتسبب بعض البكتريا تحللا تعفنيا Putrefaction اذ تحلل البروتينات لاهوائيا منتجة مركبات ذات رائحة كريهة مثل كبريتيد الهيدروجين والميركابتانات والامينات والاندول والاحماض الامينية • وتعد معظم الانواع المحللة للبروتين العائدة الى الجنس Clostridium من النوع المسبب للتحلل التعفني كما هو الحال مع أنواع Proteus والاجناس الاخرى غير المكونة للسبورات Pseudomonas, •

6.5.5. البكتريا المحللة لللبيدات Lipolytic Bacteria —

وتعد هذه مجموعة غير متجانسة الانواع من البكتريا المنتجة لانزيم اللايبيز Lipase ، الانزيم المحفز للتحلل المائي للدهون الى احماض دهنية وجليسرول • ان العديد من البكتريا المحللة للبروتين النشطة الهوائية لها القدرة على تحليل اللبيدات • وعلى سبيل المثال لبكتريا Pseudomonas fluorescens قدرة عالية جدا على تحليل اللبيدات • كما تحتوي أجناس Alcaligenes Serratia, و Micrococcus أنواعا تحلل اللبيدات •

7.5.5. البكتريا المحللة للسكر Saccharolytic Bacteria —

تحلل هذه البكتريا مائيا السكريات الثنائية او السكريات المتعددة الى سكريات بسيطة • ولعدد محدود من أنواع البكتريا قدرة تحليل الاميلوز أو الاميلوبكتين أي انها تمتلك انزيمات الاميليزات Amylases لتحليل النشا مائيا خارج الخلية • وتعد بكتريا Bacillus subtilis وكذلك Clostridium butyricum من النوع المحلل للنشا • ولعدد ضئيل من الانواع البكتيرية القدرة على تحليل السليلوز مائيا • وتصنف أنواع جنس Clostridium أحيانا الى محللة للبروتين وقد تستطيع أو لا تستطيع مهاجمة السكريات ، أو قد تصنف الى محللة للسكريات بحيث تهاجم السكريات ولا تهاجم البروتينات • فمثلا Clostridium Lentoputrescens تحلل البروتين وعادة لا تخمر

الكربوهيدرات ، في حين Clostridium butyricum لا تحلل البروتين ولكنها تخمر السكريات .

5.5.8 البكتريا المحللة للبكتين Pectolytic Bacteria —

البكتينات هي من الكربوهيدرات المعقدة وتوجد في الخضراوات والفواكه ، ويعد خليط من الانزيمات المحللة للبكتين يطلق عليه بكتينيزات Pectinases مسؤولا عن طراوة الانسجة النباتية أو فقدان القوة التهليمية لعصائر الفاكهة . وهناك بعض البكتريات (فضلا عن الاعفان) لها القدرة على تحليل البكتين منها أنواع الاجناس Erwinia ، Bacillus, و Clostridium, .

5.5.9 البكتريا المحبة للمحاليل الملحية المركزة
— Halophilic Bacteria, or Halophiles

تحتاج البكتريا المحبة للمحاليل الملحية الى تراكيز دنيا معينة من كلوريد الصوديوم المذاب لكي تنمو . ان احتياجات الملح للنمو الامثل يكون اوطأ بالنسبة للبكتريا المحبة باعتدال للمحاليل الملحية (5—20%) مما في البكتريا المحبة جدا للمحاليل الملحية (20—25%) . وتدعى بعض البكتيريات التي تنمو بشكل جيد في بيئات تركيزها الملحي 2—5% بالبكتريا المحبة قليلا للمحاليل الملحية . في حين البكتريا الاخرى هي متحملة المحبة للملح اي يمكنها ان تنمو بوجود الملح أو بدونه . وتوجد مثل هذه الانواع البكترية في الاجناس Sarcina, Halobacterium ,و Pseudomonas, Vibrio, Pediococcus, Alcaligenes.

5.5.10 البكتريا المحبة للضغط الازموزي أو التركيز العالي من السكر
— Osmophilic, or Saccharophilic Bacteria

ان هذه البكتريا تنمو في تراكيز عالية من السكر ولكن معظم البكتريا التي يطلق عليها اسم المحبة للضغط الازموزي Osmophilic هي مقاومة للسكر فحسب مثل أنواع Leuconostoc .

6. الطحالب Algae

تضم الطحالب ملفاوة برك الماء العذب ، والصبغ الخضراء على الصخور الرطبة وجذوع الاشجار ، والاعشاب البحرية الكبيرة في المحيطات . ولبساطة الطحالب فقد صنفها بعض البيولوجيين في المملكة النباتية والبعض الاخر في مملكة الاوليات Protists . الطحالب القدرة على التواجد في أماكن يصعب على غيرها من

الاحياء ان تتواجد فيها مثل المناطق الحارة او المناطق المتجمدة القطبية ، او في بيئات المياه العذبة أو البحرية . معظم الطحالب احياء حرة والقليل منها له ارتباط معيشي مع احياء أخرى كمتكافلات (في الاشنات Lichens) أو كمتطفلات .

الطحالب مجموعة من الاقسام Divisions على انها تتفاوت بين احياء وحيدة الخلية صغيرة بقدر اكبر خلية بكتيرية الى احياء معقدة متعددة الخلايا كاعشاب البحر . فهي لا تنمو في الاوساط الطبيعية كمنتجات اولية لاغذية الحياة المائية وكمجهزات الاوكسجين الحر . فالطحالب الهائمة (البلانكتونية) البحرية التي تدعى عشب البحر تمثل حوالي 90% من نشاط التخليق الضوئي على وجه الارض . وبعض الطحالب البحرية الكبيرة هي مصدر الغذاء الانسان ، والمضافات الاغذية ، والمعجنات اخرى ذات الاستعمال الصناعي . ونظرا لوجود الطحالب بشكل طافية على سطح الماء ، فانها غالبا ما تكون مصاحبة في المصادر المائية معطية روائح غير مقبولة وطعما مسببا مع غلق اجهزة الترشيح . وبسبب زيادة المخلفات المدنية التي يمكن استخدامها كغذاء من قبل الطحالب ، فان العديد من البرك والبحيرات قد اصبحت مغطاة بكثافة نتيجة لانفجار النمو الناتج من الطحالب . والطحالب على غرار البكتريا والخمائر والاعفان ذات أهمية كبيرة للبيولوجيين لكون الخلايا الطحلبية الفردية كائنات كاملة قادرة على القيام بعملية التخليق الضوئي وتخليق عدد كبير من المركبات الاخرى التي تؤلف الخلية .

8.1 الصفات العامة للطحالب

بالرغم من وجود عدد من الطحالب العديمة اللون ، فان الطحالب تحتوي عادة على الخضاب الاخضر كلوروفيل أ فضلا عن خضاب آخر .

وليس للطحالب جذور او سيقان او اوراق كما هو الحال مع النباتات الراقية الا ان بعض الطحالب البنية والحمراء تظهر ما يشبه الجذور والسيقان والاوراق . ولا توجد في الطحالب انسجة حقيقية اطلاقا وخصوصا الوعائية منها ، رغم ان بعض الـ Thalli وخصوصا في الطحالب البنية تكون معقدة .

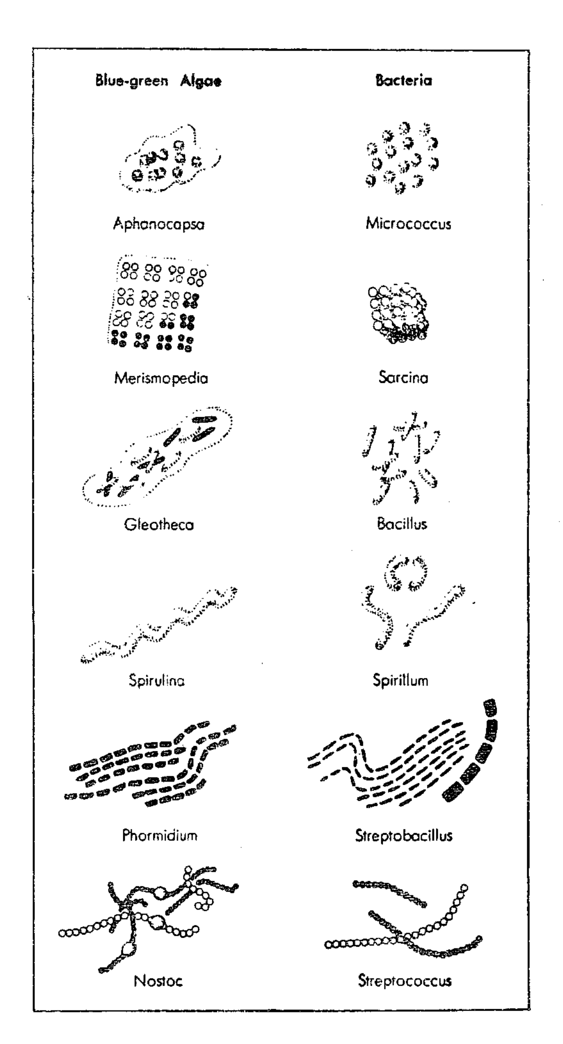
8.1.1 الصفات المورفولوجية

تتفاوت الطحالب في الحجم بين 3 ميكرونات الى 60 مترا ، وهناك ما يقارب 25.000 نوع . واحيانا يصعب ايجاد تعريف دقيق للطحالب بسبب كونها

مجموعة [illegible] جدا . وتوجد الأنواع المعروفة من الطحالب كخلايا مفردة قد تكون كروية أو بيضوية أو حلزونية . وتؤدي هذه الاختلافات في الشكل الى تجاميع معقدة [illegible] الأشكال الأميبية . وتكون الطحالب منفردة أو على شكل مستعمرات متعددة الخلايا تظهر في كل هيئة وشكل ودرجة تعقيد يمكن تخيلها ، وتشمل المستعمرات [illegible] ، والخيوط المجمعة بمفردها أو في عناقيد مع الشرائط الفردية التي قد تكون متفرعة أو غير متفرعة ، والأنابيب (التي قد تكون مقسمة أو غير مقسمة بجدر عرضية) . وبعض المستعمرات هي تجمعات بسيطة لخلايا مفردة متماثلة تلتصق ببعضها بعد الانقسام ، وبعضها الآخر يتكون من انواع مختلفة من الخلايا المتخصصة التي لها وظائف معينة وتصبح هذه المستعمرات معقدة تماما وتشابه في تركيبها النباتات الراقية .

[illegible] الخلايا الطحلبية تلك التي للنباتات والحيوانات الاخرى . ويشابه [illegible] منها البكتريا في الأشكال والتركيب . وعادة ما تصنف الطحالب [illegible] Cyanophyta [illegible] البكتريا [illegible] الانتقال الى الخضرية [illegible] بالكلوروفيل [illegible] الطحالب [illegible] . ويوضح الشكل (٢٦) التشابه المورفولوجي بين الطحالب الخضر الزرق والبكتريا .

[illegible] الأنواع الطحلبية [illegible] . أما الجدر الخلوية للطحالب [illegible] دقيقة جدا وغالبا ما تتحد [illegible] معقدة تعطي [illegible] . وتحتوي جدر الطحالب [illegible] التي [illegible] مع البكتريا . والطحالب المتحركة كاليوجلينا Euglena تحتوي على جدر خلوية مرنة تدعى Periplasts . وتحاط الجدر الخلوية لعدد من الطحالب بمادة غلاف خارجية [illegible] خلال الجدار الخلوي [illegible] بالأغلفة [illegible] البكتيرية [illegible] الخلايا في العمر تصبح هذه المادة الغلافية الخارجية منتفخة ومعرضة . وتحتوي الطحالب ، باستثناء الطحالب الخضر الزرق ، على نواة متميزة [illegible] الحيا وقطرات الزيت والفجوات . ويوجد الكلوروفيل والخضاب الاخرى في تحويات مرتبطة بالغشاء تعرف بالبلاستيدات . والطحالب الوحيدة التي لا توجد [illegible] الخلوية في بلاستيدات هي الطحالب الخضر الزرق حيث تنتشر



الشكل (8.1) التشابه المورفولوجي بين الطحالب الخضر الزرق والبكتريا

منه الاسواط بانتظام خلال البروتوبلاست • وتدعى الطحالب المتحركة بالطحالب السابحة حيث لها اسواط مفردة أو في ازواج أو تجمعات عند النهايات الامامية او الخلفية من الخلية • وقد لا تمتلك بعض الطحالب وسائل حركة لذلك فهي تنتقل بواسطة المد والجزر والامواج والتيارات • وتكون الخلايا التكاثرية اللاجنسية في بعض الطحالب مثل السبورات السابحة والامشاج هي المتحركة فحسب •

٥٠٢٣ التكاثر

أما أن تتكاثر الطحالب جنسيا أو لا جنسيا ٠ وتتميز بعض الانواع بطريقة واحدة فقط ، الا ان العديد من الطحالب دورات حياة معقدة تستخدم كلا طريقتي التكاثر السابقتين ٠

وتتضمن طريقة التكاثر اللا جنسي في الطحالب ، النوع الخضري المجرد من الانقسام الخلوي الذي تتكاثر بواسطته البكتريا ٠ وقد يبدأ خيط أو مستعمرة طحلب جديد من جزء مكسور من طحلب متعدد الخلايا قديم ٠ ومع ذلك فـان التكاثر اللا جنسي في الطحالب هو أكثر تعقيدا من هذا ويتضمن انتاج سبورات وحيدة الخلية يحتوي العديد منها ، وخاصة تلك التي في الصور المائيـة ، على اسواط تتحرك بواسطتها وتدعى هذه السبورات بالسبورات السابحة Zoospores. اما السبورات غير المتحركة التي تعرف بـ Aplanospores فمن المرجح ان تتكون بواسطة الانواع البرية من الطحالب ٠ ويطلق على الخلايا النباتية التي تنتج هذه السبورات الحوافظ السبورية Sporangia. ٠

ان جميع صور التكاثر الجنسي قد وجدت بين الطحالب ٠ وفي هذه العمليات هناك تزاوج بين الخلايا الجنسية التي تدعى الامشاج Gametes لتكوين اتحاد يحدث فيه خلط المادة النووية قبل تكوين الاجيال الجديدة ٠ وينتج عن اتحـــاد الامشاج تكوين اللاقحة Zygote ، واذا كانت هذه الامشاج متماثلة اي لا توجد أية فروقات جنسية ملحوظة فان العملية تدعى اتحاد الامشاج المتماثلة Isogamous. وعندما يتزاوج مشيجان مختلفان (ذكر وانثى) تدعى العملية اتحاد الامشاج المختلفة Heterogamous. ٠ وبتقدمنا نحو الصور الراقية من الطحالب ، وليس بالضرورة الكبرى ، تصبح الخلايا الجنسية ذكرا وانثى على نحو مميز ٠ وتكون البيضة Ovum (خلية بيضة انثوية) كبيرة وغير متحركة والمشيج الذكري (الخلية المنوية) صغيرة ومتحركة بنشاط ٠ وتوجد ايضا الـ Thalli التي هي على وجه الحصر ذكور أو اناث ٠ ورغم أن جميع النباتات قد تبدو متشابهة الا أنها من أنواع جنسية متعاكسة نظرا لان احدها ينتج امشاجا ذكرية والاخرى انثوية ٠ مثل هذه النباتات تدعى احادية الجنس Unisexual أو منفصلة الجنس Dioecious ، والنباتات التي امشاجها من وحدة خضرية ذاتها يقال عنها ثنائية الجنس Bisexual أو احادية المسكن Monoecious. ٠

2.6 تقسيم الطحالب

يختلف المختصون في تفاصيل تقسيم الطحالب ، وبصورة عامة يقسم علماء النبات الطحالب على أساس :

(1) التراكيب التكاثرية ودورات الحياة .

(2) نوع المواد المخزونة والمخزنة في الخلايا .

(3) طبيعة صبغات التمثيل الضوئي الموجودة في البلاستيدات (أي الاختلافات في أغشية الكلوروفيل والكاروتينويد والبايليبروتين) .

(4) الصفات المورفولوجية للخلايا وال Thalli .

فالطحالب الخضر الزرق Cyanophyta التي تختلف عن جميع الطحالب في افتقارها الى أغشية النواة والمايتوكوندريا والكلوروبلاست ، توضع عادة مع البكتريا في مجموعة اما ان يطلق عليها Monera او Procaryota .

والذين يعترفون بال Monera يضمون الطحالب مع البروتوزوا Monera في مملكة الاوليات Protozoa ، والذين يعترفون بالاجسام البدائية النواة Protista يضمون الطحالب مع جميع النباتات الاخرى في قسم الاجسام الحقيقية النواة Eucoryota .

وفيما يلي أهم الصفات المميزة للاقسام الرئيسة من الطحالب :-

1. Division Cyanophyta (blue-green algae)

وتعرف بالطحالب الخضر الزرق ، وهي نباتات وحيدة الخلية خيطية تتواجد في مستعمرات ، تفتقر لوجود النواة أو المايتوكوندريا ، المادة النووية متمركزة ظاهريا ، تقع صفائح التمثيل الضوئي في السايتوبلازم الخارجي ، يتحدد اللون بنسب كلوروفيل أ والكاروتينويدات والبيليبروتينات ، تتكون جدرها الخلوية اساسا من الاحماض الامينية والسكريات الامينية ، ناتج التمثيل الضوئي هو نشا سيانوفايكين Cyanophycean starch ، التكاثر الخضري أو اللا جنسي بالانقسام البسيط أو التكسر أو السبورات الخارجية أو الداخلية .

تضم 5 رتب .

2. Division Chlorophyta (green algae)

تعرف بالطحالب الخضراء ، وهي طحالب وحيدة أو متعددة الخلايا تتواجد في مستعمرات ، أحادية النواة او متعددة النوى ، أخضبتها تشبه أخضبة النباتات الراقية ، جدارها الخلوي من السليلوز ، تخزن الغذاء كنشا • تضم 3 صفوف و 14 رتبة •

3. Division Euglenophyta (euglenoids)

وتعرف باليوغلينا ، وحيدة الخلية ، تتحرك بأسواط ، قد تحتوي على اخضبة مشابهة لما موجود في النباتات الراقية •

تضم صفا واحدا و 6 رتب • يضمها البعض مع البروتوزوا •

4. Division Xanthophyta (yellow-gree algae)

وتعرف بالطحالب الخضر الصفر ، وحيدة الخلية ، توجد في مستعمرات ، خيطية ، لها كلوروفيل أ وكاروتينويدات خاصة ، متحركة بسوطين أحدهما قصير واملس والاخر طويل ، خزينها الغذائي هو الزيت أو الكريسولامينارين Chrysolaminarin •

تضم صفا واحدا و 6 رتب •

5. Division Chloromonadophyta

تضم صفا واحدا ورتبة واحدة • وقد يضمها البعض مع البروتوزوا •

6. Division Bacillariophyta (diatoms)

وتعرف بالطحالب الدياتومية (اي المشبعة جدرانها بالسليكا) ، وحيدة الخلية توجد في مستعمرات ، يتكون جدرانها الخلوي من نصفين وهو مبني من السليكا على قاعدة من البكتين ، كثيرة التزخرف بالحزوز أو الثلم ، الاخضبة الرئيسة هي كلوروفيل أ و جـ وفوكوزانثين Fucoxanthin ، ناتج تغليقها الضوئي الرئيس هو كريسولامينارين Chrysolaminarin.

تضم صفا واحدا ورتبتين •

7. Division Chrysophyta (golden algae)

وتعرف بالطحالب الذهبية ، معظم خلاياها مفردة ، العديد منها بلا جدار سليلوزي ، بعضها متصلب بالسليكا أو متكلس بالكالسيوم ، أخضبتها كلوروفيل

أ و ج وفوكوزانثين ، ناتج تخليقها الضوئي مادة كريسولامينارين ، تتكاثر بالانقسام الخلوي والسبورات السابحة Zoospores أو السبورات الساكنة Statospores.

تضم صفين و 7, رتب .

8. Division Pyrrohyophyta (dinoflagellates)

خلايا مفردة معظمها متحرك ، بعضها خيوط قصيرة ، تتحرك الخلايا باسواط ، نويها كبيرة ، أخضبتها ملونة هي كلوروفيل أ و ج مع بيريدنين Peridinin ، ناتج تخليقها الضوئي هو النشا ، تتكاثر بالانقسام الخلوي أو السبورات السابحة أو اتحاد الامشاج المتماثلة .

تضم صفين و 7, رتب .

9. Division Phaeophyta (brown algae)

وتعرف بالطحالب البنية ، يكون كلوروفيل أ و ج مغطيين بالفوكوزانثين ترى بالعين المجردة ، تعيش في البحار ، جدارها الخلوي من السليلوز والبكتين .

تضم صفا واحدا و 13 رتبة .

10. Division Rhodophyta (red algae)

وتعرف بالطحالب الحمر ، يكون الكلوروفيل مغطى بالبيليبروتينات ، مادة ترى بالعين المجردة ، تعيش في البحار ، جدارها الخلوي من السليلوز والبكتين .

تضم صفا واحدا و 12 رتبة .

11. Division Cryptophyta

عديمة اللون أو ملونة ، خضابه الملونة منها هو كلوروفيل أ و ج وزانثوفيلات وبيليبروتينات معينة ، مخزونها الغذائي يشبه النشا ، تتكاثر بواسطة الانشطار الطولي فحسب .

تضم صفا واحدا ورتبتين .

الفصل الثاني

أطوار نمو الأحياء المجهرية

Growth Phases of Microorganisms

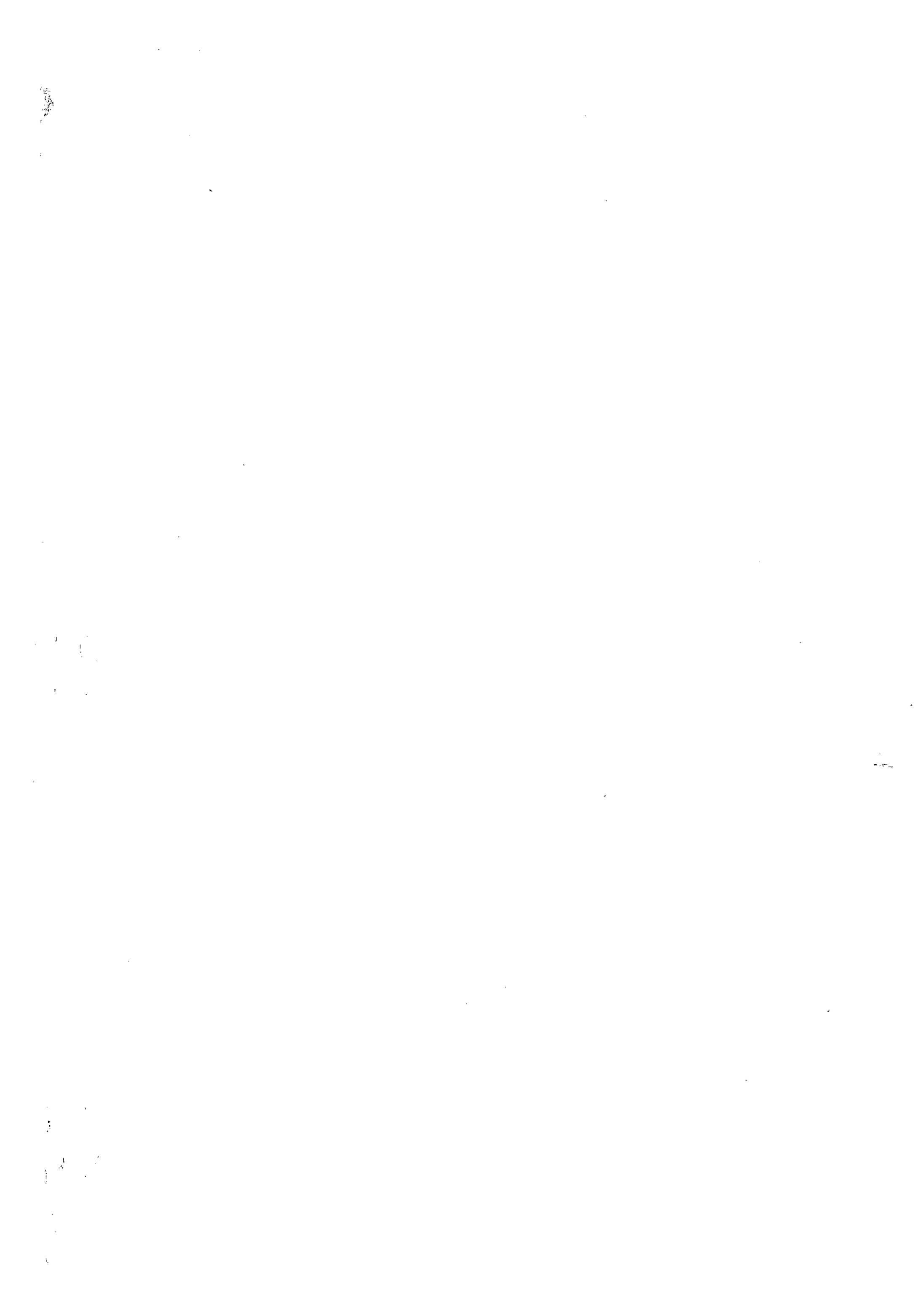
1. التكاثر الخلوي
2. منحنى النمو

1.2. طور الركود

2.2. طور النمو اللوغاريتمي

3.2. الطور الثابت

4.2. طور تناقص النمو أو طور الموت



ومن أ... الأحياء المجهرية في بيئة مناسبة ملائمة من ظروف النمو ملائمة

يعني في البيئة ... عدد كبير من الخلايا نتيجة لانقسامها

وتكاثرها ، ويحصل هذا بعض الأحياء المجهرية كالبكتريا مثلا التي تحتاج الى فترة

لا ... ان بعض الأنواع الأخرى تتطلب وقتا أطول من ذلك ليصل

تعدادها بالزيادة الى الحد الأقصى . ان نمو المجموعة يتوقف على نمو الفرد ومقدرته

على التكاثر . وقد اصطلح بعض المايكروبيولوجيين على استعمال كلمة نمو

Growth للاشارة الى الزيادة في الكتلة الخلوية Cell mass سواء كان ذلك

للخلية الواحدة أو لمجاميع من الخلايا . وان استعمال كلمة تكاثر Reproduction

يشار بها الى الزيادة في عدد الخلايا Cell numbers نتيجة الانقسام ، الا أننا

سوف نستعمل كلمة نمو Growth هنا للاشارة الى كل من الزيادة في الكتلة الخلوية

وفي تعداد الخلايا أيضا . ان قدرة الخلايا الميكروبية على الانقسام تعد الطريق

المعتاد للحكم على حيويتها . وفي الحقيقة ان بعض الخلايا الميكروبية غير الحية

يكون لها بعض النشاط الأيضي ولكنها لا تقدر على التكاثر لفساد نظمها الخاصة

بالانقسام .

ان مقدرة الخلية الحية على النمو والتكاثر تتوقف كثيرا على كفاءتها في

تجهيز مواد بروتوبلازمية جديدة من مصدر الغذاء المحيط بها . كما أن تحويل

المواد الخام الى نواتج تفاعل يتم بمساعدة الجهاز الانزيمي الخلوي وهذا بدوره

يكون محكوما بالنظام الوراثي للخلية .

ان نمو وتكاثر الخلايا الميكروبية يمثل عملية دورية ، فكل خلية جديدة

تتكون ، تصبح ذات قدرة على التكاثر ، بمعنى ان الخلايا الجديدة الناتجة عن

الانقسام تمتلك الخصائص الفسيولوجية التي كانت تميز أسلافها القادرة على

التكاثر .

وتتلخص عملية التكاثر عند بدء الخلية في النمو بزيادة محتوياتها

البروتوبلازمية نتيجة لحدوث عدة تفاعلات غير مرتبطة ببعضها . وتتوزع المواد

الغذائية داخل الخلية عقب عبورها خلال الغشاء السايتوبلازمي .

فالجزيئات الكبيرة التي لا يمكنها المرور خلال هذا الغشاء مثـل السكريات المتعـددة Polysaccharides والبروتينات تهضم خارجيا عن طريق انزيمات تفرزها الخلايا خارجيا لتحليل هذه المركبات المعقدة الى وحدات اصغر حجما مثل السكريات الاحادية أو الاحماض الامينية والتي لها قدرة اكبر على المرور خلال الغشاء السايتوبلازمي • والمكونات الاساسية في بناء البروتوبلازم الجديد ، أما ان تؤخذ مباشرة من المواد الغذائية الداخلة للخلية أو أن تتحول هذه المواد داخليا الى مواد أخرى أكثر ملاءمة لبناء البروتوبلازم •

ان تخليق البروتينات والكربوهيدرات والدهون والاحماض النووية الجديدة في الخلية يتطلب تجهيز عدد كبير من المواد الكيمياوية التي تدخل في تركيب المواد المخلقة وترتب هذه المواد بطرق خاصة باختلاف نوع الكائن الحي المجهري •

فالخلية الميكروبية اذن تنمو طبقا لنظام مرسوم ومحدد قبل انقسامها ، وان هذا النظام يتكرر بتكرار انقسام أجيالها المتعاقبة ما لم يحدث تغيير في جهـاز الخلايا الوراثي • فالنظام الوراثي للخلايا هو الذي يتحكم اذن في كيفية تخليقها للمواد البنائية وفي درجة انقسامها •

2. منحنى النمـو Growth Curve

تعتمد طرق تقدير النمو الميكروبي كميا على طبيعة عمليات النمو نفسـها بمعنى انها تعتمد على الزيادة في كمية البروتوبلازم الميكروبي أو في عدد الخلايا المتكونة نتيجة للتكاثر • وفي بعض الاحيان قد يمكن قياس نشاط واحد أو أكثر من النظم الانزيمية الخلوية بصفتها تمثل احد المكونات البروتوبلازمية •

ويقدر النمو كميا بطرق عديدة مبنية على الاسس الاتية :ـ

اولا – تقدير عدد الخلايا Cell Count مباشرة (باستخدام المجهر) أو بطرق غير مباشر (باجراء عد المستعمرات) •

ثانيا – تقدير الكتلة الخلوية مباشرة عن طريق الوزن الرطب أو الوزن الجاف أو عن طريق تقدير كمية النتروجين الخلوي ، أو بطريق غير مباشر بتقدير درجة تعكير البيئة (وخاصة للاحياء المجهرية الوحيدات الخلية حيث تكون الكثافة الضوئية دالة على حجم وعـدد الخـلايا الناميـة والتي يمكن أن

تنسب الى الوزن الجاف) .

ثالثا – تقدير النشاط الخلوي وهي طريقة غير مباشرة لتقدير النمو وذلك بمقارنة النشاط الانزيمي المتحصل عليه بكمية النمو المراد قياسها .

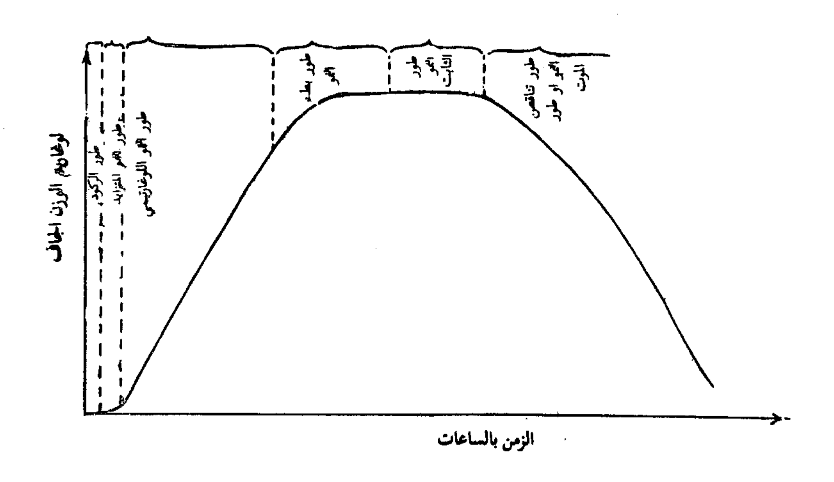
ولقد وفرت الدراسات على نمو المزارع البكتيرية فرصة ممتازة لدراسة الاحياء المجهرية بشكل عام . فالخلية الميكروبية الواحدة تكفي لانشاء مجموع ميكروبي جديد . وهناك مجموعة من الطرق البحثية المختلفة تعتمد اعتمادا كليا على هذه الحقيقة ، مثل طرق زرع الاحياء المجهرية ، وتنقية الانواع الميكروبية واستعمال الطفرات الكيموحيوية وايجاد سلالات مقاومة للمواد الكيمياوية السامة .

وعند تلقيح بيئة غذائية بخلية ميكروبية واحدة فانها تبدأ في الانقسام الى خليتين وتستمر الخلايا الناتجة بالانقسام المتكرر . ويعرف الوقت الذي ينقضي بين تكوين الخلية واقدامها على الانقسام بوقت الجيل Generation time. ان فترة وقت الجيل هذه تعتمد على عدة عوامل منها السلالة الميكروبية ، ونوع وتركيب البيئة الغذائية ، ودرجة الحرارة ، وعمر المزرعة . وعموما تتفاوت هذه الفترة في البكتريا وتحت ظروف البيئة المثالية بين 20 دقيقة الى عدة ساعات . كما يمكن تحديدها تحت ظروف معينة باستعمال مزارع ميكروبية نقية .

وعندما يرسم لوغاريتم الوزن الجاف لكائن حي مجهري وحيد الخلية نام في بيئة محصورة مع الزمن يتحصل على منحنى متميز ، ويعتمد الشكل التفصيلي له بنوع الكائن الحي المجهري وبالظروف البيئية (الشكل (1.2)) .

يلاحظ من المنحنى ان الكائن الحي المجهري يتوقف عن الانقسام لفترة عقب تلقيح البيئة الغذائية وتسمى هذه الفترة طور الركود Lag phase. وبعد انتهاء هذا الطور تبدأ الخلايا في الانقسام ولكن ببطء ملحوظ ثم يسرع معدل الانقسام حتى يصل الى درجة تثبت عليها سرعته وتعرف هذه الفترة بطور النمو اللوغاريتمي Logarithmic or exponential growth phase او يطلق عليه Log phase .

ويميل بعض الباحثين الى اعتبار المرحلة الاولى من الطور اللوغاريتمي والتي يظهر بها زيادة متدرجة في تعداد الخلايا طور منفصلا يعرف بطور النمو المتزايد Accelerated growth phase ، والسبب في تدرج النمو في هذه الفترة



الشكل ((1.2)) منحنى نمو كائن حي مجهري في بيئة مغمورة ٠

ان الخلايا جميعا لا تكمل فترة ركودها في وقت واحد وينتهي هذا الطور التضير بانتظام معدل النمو وثبات وقت الجيل ودخول الخلايا في الطور اللوغاريتمي ٠ وكذلك يميل البعض الاخـر من الباحثين الى اعتبار المراحـل النهائيـة من الطور اللوغاريتمي والتي يظهـــر بهـا بطء فـي معـدل الانقسـام والتكاثـر طـورا منفصلا يعـرف بطور بطء النمـو Retardation growth phase. ٠ وينتهي الطور اللوغاريتمي عندما يبطيء معدل التكاثر وتزداد فترة وقت الجيل ويثبت تعداد الخلايا الحية بالمزرعة ٠ عندئذ يقال ان المزرعة قد دخلت طورها الشـابت من النمو Stationary phase وفي خـلال هذه الفترة يكون هنـاك تـوازن بين عدد الخلايا المنقسمة وعدد الخلايا الميتة ٠ وقد يختل هذا التوازن حيث يزداد تعداد الخلايا الميتة عن تعداد الخلايا المنقسمة ، أو بمعنى آخر لا يكـون هناك تعويض لمعدل الموت بتكوين خلايا جديدة ، ويعرف هـذا الطور من النمو بطـور تناقص النمـو أو طور المـوت Decline or Death Phase ٠ هـذا هـو تسلسل احداث النمو عندما تلقح بيئة غذائية بلقـاح ميكروبي معين ، وبالرغـم من ان

شكل المنحنى قد يتغير قليلا تبعا لنوع الكائن الحي المجهري النامي أو لظروف النمو ، الا ان اتجاهاته واطواره لا تختلف كثيرا عن تلك المبينة في الشكل (1.2) • ويحسن هنا مناقشة الطرق التي يتم بها النمو والظروف التي يتأثر بها في كل من الاطوار الاربعة الرئيسة المشار اليها سابقا •

1.2. طور الركود The lag phase

لاي كائن حي مجهري ، فان الفترة التي تنقضي بين تلقيح البيئة الغذائية والكشف عن نمو مرئي تعرف بطور الركود • ان هذه الفترة هي فترة تأقلم على الظروف البيئية الجديدة ، وتعتمد مدتها على طبيعة الكائن الحي المجهري ، وحجم اللقاح ووضعه الفسيولوجي ، وكمية البيئة المنقولة من اللقاح ، والتراكيز المتغيرة من المواد الايضية الاساسية في البيئة الجديدة ، ودرجة الحرارة ، وأحيانا نوعية وكثافة الاضاءة • وعموما فان طور الركود يمكن تقصيره بزيادة حجم اللقاح ، وبزيادة درجة الحرارة الى الدرجة المثلى وبنقل بيئة غذائية متكاملة • ويمكن تقصيره كثيرا أو حتى حذفه بواسطة التلقيح بمزرعة في طور نموها اللوغارتمي • ويعلل ذلك بزيادة كمية المواد المشجعة للانقسام والتي يحملها اللقاح الكبير الحجم الذي يعتقد انه RNA أو المواد المكونة له •

ان عدم حدوث انقسام في هذه الفترة لا يجوز ان يفهم منه توقف الخلايا عن النمو الفردي كلية • فان الركود الملحوظ هو ركود في حدوث عملية الانقسام فقط ، ولكنه ليس ركودا في عمليات التخليق البروتوبلازمي بداخل الخلية •

ومن الدراسات السايتولوجية التي أجريت على الخلايا في هذا الطور يتبين انها تزداد في الحجم لتصل الى ضعف او ثلاثة أضعاف حجمها الاصلي • وقد بنيت الدراسات الكيموحيوية زيادة معدل النشاط الايضي خلال فترة الركود ، كما بينت ايضا زيادة كمية المكونات الاساسية للمحتويات النووية من البيورينات والبيريميدينات Purines & pyrimidines والمحتويات البروتينية بالخلية ، الا ان زيادة نسبة البروتين تكون أقل نسبيا من الزيادة في المحتويات النووية •

وقد اظهرت الدراسات الكيمياوية ان هناك زيادة في محتويات الخلية من RNA خلال فترة الركود ، وهو من المكونات الاساسية للسايتوبلازم في حين ان

محتويات الخلية من DNA المميز للمحتويات النووية لم تتأثر نسبته بالخلية خلال هذه الفترة ٠

ومن ناحية أخرى يمكن اطالة فترة طور الركود عند تلقيح الاحياء المجهرية في بيئة تختلف عن تلك التي كان اللقاح ناميا بها حيث ان تأقلم اللقاح للنمو على البيئة الجديدة يتطلب وقتا أطول ٠ ويمكن تقصير فترة الركود للاحياء المجهرية غير ذاتية التغذية بنقل اللقاح من بيئة بسيطة الى بيئة معقدة كما يمكن اطالة فترة هذا الطور لمثل هذه الاحياء عند اجراء العكس ٠

وتكون خلايا الاحياء المجهرية اكثر حساسية للتغيرات الحرارية وهي في طور ركودها فعندما تكون درجة الحرارة قريبة من الدرجة المثالية للنمو يمكن تقصير فترة الركود كما ان الزيادة أو النقص في درجة الحرارة عن الدرجة المثالية يطيل من فترة هذا الطور ٠

2.2 طور النمو اللوغاريتمي Logarithmic or exponential growth phase

سبق أن ذكرنا ان وقت الجيل يكون ثابتا خلال الطور اللوغاريتمي من النمو ، وأن طول وقت الجيل لنوع الاحياء المجهرية يتحدد عادة نتيجة لتفاعل العوامل الوراثية والظروف البيئية السائدة ٠ فقد وجد أن وقت الجيل يتفاوت بين 15 دقيقة في بعض أنواع البكتريا الى عدة أيام في بعض الفطريات الخيطية Filamentous fumgi ٠

ويعزى تفاوت طول فترة وقت الجيل للاحياء المجهرية المختلفة الى تفاوت قدراتها التخليقية للبروتوبلازم لا الى معدل او سرعة الانقسام ، اذ لوحظ ان الزيادة في محتويات الخلايا من النتروجين تكون متلازمة مع الزيادة في عدد خلايا الطور اللوغاريتمي ٠ وقد لوحظ ان درجة الحرارة أثناء فترة الحضانة تؤثر الى حد كبير في معدل النمو أثناء هذا الطور وحيث ان عمليات النمو تعتبر عمليات كيموحيوية فاننا نتوقع اذن مضاعفة النمو كلما ارتفعت درجة حرارة الزرع بمقدار 10 درجات مئوية ٠ وقد وجد أن هذا صحيح في حدود معينة من الحرارة تتراوح بين 20-40 م ففي حدود هذا المجال نجد أن البروتين الميكروبي يتأثر قليلا أو بدرجة غير ملحوظة ، ولكن اذا ارتفعت درجة الحرارة عن 40 م فانه يحدث تثبيط حراري للبروتين الانزيمي بالخلية الميكروبية مما يقلل من معدل النمو ٠

ودرجة الحرارة المثالية للنمو والتي عندها يكون وقت الجيل أقصر ما يمكن هي محصلة بين التأثير المنشط للتفاعلات الانزيمية الخلوية عند ارتفاع درجة الحرارة وبين تأثيرها الضار في البروتين الانزيمي ٠

وبالاضافة الى ذلك فان مكونات البيئة الغذائية يمكنها أيضا أن تتحكم في طول فترة وقت الجيل ٠ واذا لم تتمكن خلايا الاحياء المجهرية من تجهيز مادة غذائية معينة فيشترط اذن اضافتها الى البيئة ، وتعرف هذه المواد المضافة بالمواد الغذائية الاساسية Essential nutrient ٠ وبعض المواد يمكن للخلايا تجهيزها بسرعة والبعض الاخر يجهز ببطء ، كما ان من المواد ما لا يمكن للخلايا تجهيزها على الاطلاق ، ومن هنا يمكننا ان نتفهم مدى تأثير اضافة أو غياب مثل هذه المواد على طول فترة وقت الجيل ٠ وهناك بعض المواد تعتبر منشطة للنمو فقط بمعنى انها ليست من المواد الاساسية ولكن وجودها في البيئة يؤدي الى تقصير فترة وقت الجيل ٠

وعموما وجود المواد الغذائية في البيئة لا يؤثر في معدل النمو وطول وقت الجيل فقط ، بل ان تراكيز هذه المواد في البيئة لها أيضا تأثير واضح في النمو ومعدلاته ٠ لذلك فانه يمكن اطالة فترة وقت الجيل في مزرعة ميكروبية بتغيير بيئتها الغذائية او بتقليل تركيز أحد مكوناتها ٠

اذا كان تركيز مكونات البيئة الغذائية محدودا فان المحصول الكلي للنمو الميكروبي يكون متلازما على هذا التركيز ، فالمزرعة تنمو فترة من الزمن ثم تتوقف عن الانقسام نظرا لاستهلاك بعض أو كل محتويات البيئة من الغذاء ٠

أما اذا اضيف المزيد من المواد الغذائية الى هذه المزرعة فانها تستعيد نشاطها ويبدأ الانقسام الخلوي من جديد ٠ ولكن عند الوصول الى حد معين يتوقف النمو كلية حتى ولو توفرت المواد الغذائية في البيئة اذ ان النمو لا يمكنه أن يستمر الى ما لا نهاية ٠

٣-٢ الطور الثابت Stationary phase

ان نضوب المواد الغذائية من البيئة او تراكم النواتج المتخلفة فيها سيحدد في النهاية الزيادة اللوغارتمية في الكتلة الخلوية ٠ فالظروف البيئية الاقل ملاءمة

تسبب بالتالي نقصا متزايدا في معدل النمو حتى الوصول الى الطور الثابت من النمو ، عندما تبقى كمية الكتلة الخلوية في المزرعة ثابتة · في الاحياء المجهرية وحيدة الخلية قد يتم الطور الثابت بسرعة ، ولكن في الاحياء الخيطية توجد في الغالب فتـــرة طويلة من النمو الاكثر تحديدا ، والذي خلاله يستمر الوزن الجاف بالتزايد بشكل جوهري ولكن بطريقة خطية تقريبا · وقد يعزى السبب الى النقص التدريجي في معدل انتاج فروع خيطية جديدة بموازاة نمو قمي مستمر في الهايفات الموجودة · أو قد يعود السبب الى ترسيب احتياطيات الغذاء أو تكوين مضادات حيوية أو مواد ايضية أخرى بواسطة ميكانيكية التحويل الايضي · وقد أورد باحثون عديدون عدة أسباب لتفسير توقف المزارع الميكروبية عن النمو عندما تصل الى حد معين · ومن هذه الاسباب نفاذ المواد الغذائية من البيئة ، وزيادة تركيز المواد الايضية الناتجة عن النشاط الخلوي اذ ان هذه المواد قد تؤدي الى خفض قيمة pH البيئة الى حد يمنع التكاثر أو تكون هذه المواد ذاتها سامة للخلايا النشطة ·

ويتوقف طول فترة الطور الثابت على درجة حساسية خلايا الاحياء المجهرية للظروف السائدة في البيئة حيث يظل عدد الخلايا الحية المنقسمة ثابتا بها · فكلما زادت حساسية الخلايا وكانت الظروف غير ملائمة قصرت فترة الطور الثـــابت من النمو ·

4.2. طور تناقص النمو أو طور الموت Decline or death phase

وهذا الطور يعقب الطور الثابت حين يبدو أن معدل موت الخلايا الميكروبية يزيد عن معدل التكاثر وتكوين خلايا جديدة · ويرجع ذلك الى عدة اسباب تختلف باختلاف نوع الاحياء المجهرية النامية · والتحول المفاجيء من الطور الثابت الى طور الموت يتضمن معدلا لوغاريتميا لموت الخلايا هو عكس المعدل اللوغاريتمي للنمو المميز للطور اللوغاريتمي · وقد يستمر ثبات معدل الموت لعدة أيام أو تموت كل الخلايا خلال هذه الفترة حسب نوع الاحياء المجهرية ·

الفصـــل الثـــالث

الاحتياجات الغذائية للاحياء المجهرية

Nutritional Requirements of Microorganisms

1. مقـــدمة
2. مصدر الماء
3. مصدر الطاقة
4. مصدر الكربون
5. مصدر النتروجين
6. مصدر العناصر المعدنية
7. عوامل النمو

يستخدم الغذاء في معظم الخلايا الحية لتأدية وظيفتين اساسيتين هما توليد الطاقة وبناء البروتوبلازم ٠ وفي كل الخلايا الحية حيوانية او نباتية ، يتركب البروتوبلازم الخلـوي من مركبات تحتـوي على عناصر الكربون ، والهيدروجين ، والاوكسجين ، والنتروجين ، والفوسفور والكبريت بالاضافة الى بعض العناصر الاخرى التي تتواجد في البروتوبلازم بكميات ضئيلة جدا ٠ فالبيئـة التي يعيش فيها الكائن الحي المجهري يجب ان تحتوي على كل هذه العناصر في صورة سهلة التناول ٠ ويمكن تلخيص الاسس التي تحدد صلاحية المواد لتكون مواد غذائية في الاتي :ـ

أولا ــ ان تكون لها القــدرة على عبـور الغشـاء السايتوبلازمي عن طريق الانتشار Diffusion او الانتقال Transport أو أن تتحلل خارج الخليـة بواسطة انزيمات خارجية Extracellular enzymes الى وحـــدات أقـل تعقيدا يمكنها الدخول الى الخلية ٠

ثانيا ــ ان يكون للخلية كل النظم الانزيمية القادرة على دمج المادة الغذائية في بروتوبلازمها دون ان تحدث اي تغيير أو أن تحولها كيمياويا الى جزيئات أكثر صلاحية من جزيئات المادة نفسها على تكوين البروتوبلازم الخلوي ٠ أو أن تحتوي الخلية على نظم انزيمية يمكنها مهاجمة المادة الداخلة وانتاج طاقة ٠

وخلاصة القول يشترط في المادة الغذائية ، أولاً قدرتها على الدخول الى الخلية ، وثانيا ان يكون الجهاز الخلوي قادرا على استعمالها ، وكلاهما يعتمد ان على نوع المحتويات البروتوبلازمية في الخلية ٠

وتختلف الاحياء المجهرية في إحتياجاتها الغذائية وذلك لانها تختلف اساسا في مقدرتها على استهلاك وتخليق المواد المختلفة وعوامل النمو من مواد غـذائية بسيطة ويبرز هذا الاختلاف حتى بين الانواع المختلفة للجنس الواحد ٠ وعمـوما فان لجميع الاحياء المجهرية متطلبات عامة تعتبر اساسية لنموها وتكاثرها ، وهذه المتطلبات هي مصدر للماء ، والطاقة ، والكربون ، والنتروجين ، والعناصر المعدنية ، وعوامل النمو ٠

2. مصدر الماء Water source

علاوة على كون الماء أحد المكونات الرئيسة للخلية الحية ، فانه يعتبر أساسيا لعمل البروتين الانزيمي ، ولاذابة المواد الخلوية العضوية واللاعضوية وكذلك كمادة تفاعلية في العديد من العمليات الايضية ٠

وبالرغم من ان التفاعلات الايضية تتضمن العديد من التفاعلات الكيمياوية المنتجة للماء الا أنه من المشكوك به ان مثل هذا الماء المنتج أيضيا يمكن أن يفي الى حد كبير بالمتطلبات المائية للكائن الحي المجهري لكي ينمو ٠

وبالاضافة الى وظائف الماء السابق ذكرها ، فقد وجد في عمليات التخمر المغمور ان الماء خارج الخلية يجهز معلقا مائيا لخلايا الاحياء المجهرية ، وكذلك شبكة منتظمة لتوزيع المواد الغذائية والاوكسجين وبيئة ملائمة لتنظيم درجة الحرارة بواسطة انتقال حراري سريع ٠

ويتم تنظيم كمية ما تأخذه الاحياء المجهرية من الماء والايونات بواسطة الاغشية شبه المنفذة ، والتي من المحتمل ان تتكون من غشاء لايبوبروتيني ٠

فالجزيئات الصغيرة ومن ضمنها جزيئات الماء تكون قادرة على النفاذ خلال مسامات هذه الاغشية ، ولكن المواد ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة يجب ان تهضم اولا بواسطة الانزيمات الخارجية ٠ وعادة يكون للعصارة الخلوية تركيز أيوني اعلى من الوسط الخارجي ، وبذلك فان الازموزية تحدد دخول الماء بواسطة الانتشار خلال الاغشية شبه المنفذة حتى يتم منعه بواسطة الضغط الانتفاخي Turgor pressure (وهو الضغط الهيدروستاتيكي التي تبذله الخلايا بواسطة ضغط البروتوبلاست المتوسع على خلايا او اغشية جدار الخلية شبه الصلبة) أو حتى تصبح التراكيز الخارجية والداخلية متساوية ٠

وتكون الايونات اللاعضوية والمواد الاخرى ذات الوزن الجزيئي الصغير قادرة على دخول الخلايا بواسطة الانتشار السلبي Passive diffusion ، ولكن بمعدل أبطأ من معدل دخول الماء ٠ ولبعض الاحياء المجهرية القدرة على اسراع هذه العملية بعمل ميكانيكيات للانتقال النشط ٠ وتكون هذه العمليات مدعومة بواسطة الطاقة الخلوية ، وهي تسمح بتراكم المواد الغذائية الخلوية اتجاه انحدار او تدرج التركيز Concentration gradient .

3. مصدر الطاقة Energy source

بالرغم من ان معظم الاحياء المجهرية تحصل على الطاقة اللازمة لها عن طريق تحويلها للمركبات الكيمياوية ، الا ان عددا قليلا منها يمكنه ان يستخدم الطاقة الضوئية بطريقة مماثلة لما تقدم به النباتات الخضراء . فالاحياء المجهرية الممثلة للضوء Photosynthetic مثل بعض البكتريا والاشنات تحتوي على صبغات ملونة تشبه الكلوروفيل النباتي وان هذه الصبغات تعمل كعامل مساعد في استغلال الطاقة الضوئية لتحويل ثاني أوكسيد الكاربون الى كربوهيدرات تدخل في بناء البروتوبلازم الخلوي . من ذلك نرى ان الاحتياجات الغذائية لهذه الاحياء المجهرية تكون مرتبطة بعملية التمثيل الضوئي والاحياء المجهرية الاخرى التي تحصل على طاقتها عن طريق كيمياوي Chemosynthetic ، قد تحتوي على صبغات مختلفة ولكن لا يمكن لاحداها أن تستفيد من الطاقة الضوئية . الا أنها تكون قادرة على القيام ببعض التفاعلات الكيمياوية والتي ينتج عنها مركبات غنية بالطاقة .

ويمكن تقسيم هذه الاحياء المجهرية الى مجموعتين :-
احداهما تستخدم مركبات كيمياوية غير عضوية للحصول على مصدرها من الطاقة وهذه تعرف بذاتية التغذية Autotrophs ، والاخرى تستخدم مركبات كيمياوية عضوية للحصول على الطاقة وتعرف بالاحياء غير ذاتية التغذية Heterotrophs.

ويمكن بسهولة التمييز بين الاحياء المجهرية الاجبارية في تغذيتها الذاتية Strict autotrophs وبين الاحياء المجهرية غير ذاتية التغذية اجبارا ، strict heterotrophs ، الا أنه يصعب التمييز بينها وبين الاحياء المجهرية ذاتية التغذية اختيارا Facultative autotrophs والتي يمكنها ان تحصل على غذائها بالطريقتين الذاتية أو غير الذاتية .

فالاحياء المجهرية الذاتية التغذية اجبارا تنمو فقط على بيئات تتكون من مواد غير عضوية ويمكنها أن تؤكسد المواد غير العضوية للحصول على الطاقة اللازمة لها لتمثيل ثاني اوكسيد الكربون . ويتطلب في بعض انواع البكتريا وجود الكبريت أو المواد الكبريتية مثل افراد جنسي **Thiobacillus, Beggiatoa** ، في حين في بعض أنواع البكتريا يتطلب وجود الامونيا كما هو الحال في أفراد الجنس **Nitrosomonas** أو النتريت NO_2 كما في أفراد الجنس **Nitrobacter**. .

والاحياء المجهرية غير ذاتية التغذية اجبارا يمكنها استخدام غاز CO_2 ولكن يلزمها مصدر خارجي من مواد كربونية عضوية مثل الكربوهيدرات والاحماض الدهنية أو الكيتونية أو الامينية • ولا تعمل هذه المواد كمصدر للكربون لبناء البروتوبلازم فقط بل يمكن لها أن تعمل كمصدر للطاقة نتيجة للنشاط الايضي الخلوي •

وبين المجموعتين السابقتين نجد بعض الاحياء المجهرية ذاتية التغذية اختيارا يمكنها ان تعيش باحدى الطريقتين ومن أمثلة هذه الاحياء المجهرية ، تلك التي يمكنها ان تمثل الهيدروجين الجوي عند تنمو بطريقة ذاتية التغذية ، ويمكن تمييز أفراد هذه المجموعة عن طريق المواد التي تستخدمها في اكسدة الهيدروجين وهذه اما ان تكون كبريتات او اوكسجين او ثاني اوكسيد الكاربون • وهذه الاحياء المجهرية يمكنها أن تعيش بطريقة غير ذاتية التغذية حين يمكنها ان تستغني عن عملية تمثيل او اكسدة الهيدروجين للحصول على طاقتها • من ذلك نرى ان طريقة تغذية الاحياء المجهرية ذاتية التغذية اختيارا تعتمد كلية على الظروف التي تعيش فيها ، فاذا توفر الهيدروجين وثاني اوكسيد الكربون فانها تنمو ذاتية التغذية وعند وجود او توفر المواد العضوية يمكنها ان تستغني عن احتياجاتها من الهيدروجين الجوي •

A- مصدر الكربون Carbon source

ان الاساس الذي يحدد وظيفة المادة في تغذية كائن حي مجهري معين في كونها مصدرا وحيدا للكربون أو النتروجين ، يعتمد على ما اذا كانت هذه المادة يمكن تحولها الى كل المواد الوسطية الاساسية التي تتكون عن طريقها المواد البنائية كالكربوهيدرات والبروتينات والدهون والاحماض النووية •

ويعد الكربون ضروريا لتخليق مادة الخلية ، ولكن الصورة التي يمكن بها أن تستخدم تعتمد على الوسائل المتبعة بواسطة الكائن الحي المجهري لتجهيز نفسه بالطاقة • فالاحياء المجهرية غير ذاتية التغذية تسد اغلب احتياجاتها من الكربون بواسطة ادخال المواد الايضية الناتجة من تكسير المركبات العضوية والتي أيضا تعتبر مصدرا لطاقتها • ومن الناحية الاخرى ، فان الاحياء المجهرية ذاتية التغذية تكون

قادرة على تحفيز التحلل الضوئي للماء وهذا يسمح بتثبيت ثاني اوكسيد الكربون الجوي واستخدامه كمصدر وحيد للكربون • وتوفر ذرتا الهيدروجين الناتجتان من تحلل كل جزيئة ماء سعة اختزالية انزيمية ضرورية لتثبيت ثاني اوكسيد الكربون كمركب جليسرالدهيد - 3 - فوسفات ، وذرة الاوكسجين المتبقية أما ان تتحرر كأوكسجين جزيئي (بواسطة الطحالب والنباتات الراقية) أو أن تنقل الى مادة تفاعل لا عضوية قابلة للاكسدة ومحتوية على هيدروجين أو كبريت (بواسطة البكتريا الممثلة للضوء) • كلا هاتين العمليتين الذاتيتي التغذية تسمح للاحياء المجهرية بتحويل ثاني اوكسيد الكربون الى جليسرالدهيد - 3 - فوسفات ، وهذا المركب وبسبب دوره الوسيط في أيض الكربوهيدرات للاحياء المجهرية ، يكون قادرا على تجهيز الطاقة والمركبات الكربونية اللازمة لنمو الخلية • وهناك بعض المواد الكربونية تستخدم بواسطة الاحياء المجهرية غير ذاتية التغذية لانتاج الطاقة ، ولكن اذا لم ينتج منها كل المركبات الوسطية الاساسية اللازمة لعمليات التخليق فانها لا تصلح في تغذية هذه الاحياء المجهرية كمصدر وحيد للكربون •

5- مصدر النتروجين Nitrogen source

تظهر الاحيـاء المجهرية اختلافا كبيرا في استخدامها لمصادر النتروجين • فالعديد من الاحياء المجهرية يكون ذاتي التغذية بالنسبة للنتروجين ، لتمكنه من النمو في وجود النترات ، والامونيا ، وفي بعض الاحيان على النتروجين الغازي كمصدر وحيد للنتروجين ، في حين أن أحياء مجهرية أخرى تحتاج الى وجود هذا العنصر بصورة أحماض أمينية أو بصورة قواعد البيورين Purine والبيريميدين Pyrimidine • فالاحياء المجهرية التي تحتاج الى أحماض أمينية قد تكون فقيرة غذائيا ، أما لعدم قدرتها على تخليق مجاميع الامين أو لفشلها في تخليق أحماض أمينية معينة •

فالاحتياج من الاول يمكن تحقيقه بتوفير أي حامض من مجموعة الاحماض الامينية كمصدر للنتروجين ، ولكن الاكثر دقة من ذلك هو توفير مسبق للاحماض الامينية الناقصة فعلا والمؤثرة في عملية النمو •

كما ذكرنا فان الاحياء المجهرية الذاتية التغذية يمكنها استخدام الامونيا أو

أيون الامونيوم كمصدر وحيد للنتروجين على أن يستوفي الشروط الاساسية بمعنى امكانيـة تحـولها الى كل المركبات الوسطية الاساسـية اللازمـة لتخليـق المركبات النتروجينية • فالامونيا تتحول الى أحماض امينية وهي الوحدات البنائية للبروتينات عن طريق تثبيتها مع واحد من الحامضيين الكيتونيين الاساسيين ، الاوكزالوأستيك Oxaloacetic أو الفاـكيتوجلوتاريك α-Ketoglutaric النــاتجين من تحـولات الجلـوكوزالايضـية وينتـج عن ذلك امـا الحامض الاميني الاسبارتيك Aspartic أو الحامض الاميني الجلـوتاميك Glutamic • ومن هـذين الحامضين الامينيين تتكون الاحماض الامينية الاخرى اللازمة عن طريق انتقـال مجموعة الامين من أحد هذه الاحماض الى أي حامض كيتوني مناظر • وقليل من الاحماض الامينية اللازمة لعمليات البناء قد تتكون بطرق خاصة أخرى غير عملية انتقال المجاميع الامينية Transamination السابق الاشارة اليها •

وبالاضافة الى ما تقدم فان لايون الامونيوم القدرة على الاندماج مع المجاميع الفعالة لبعض الاحماض الامينية المعنية مثل مجمـوعة الجوانيدين Guanidine في الحامض الاميني الارجنين Arginine ، وفي حلقات البيورين Purine أو البريميدين Pyrimidine في جزيئات الاحماض النووية • وعندما تمتلك الخلية الميكروبية القدرة على كل طرق تثبيت الامونيا السابقة الذكر وكذلك كل طرق تحول المركبات الناتجة من هذا التثبيت الى مركبات ضرورية لعملية البناء يمكـن للامونيا او ايون الامونيوم حينئذ ان تعمل كمصدر وحيد للنتروجين لنمو هـذا الكائن الحي المجهري • أما اذا كانت الخلية الميكروبية غير قادرة على القيام بواحدة أو بأكثر من هذه التفاعلات فانه يلزم حينئذ اضافة الحامض او الاحماض الامينية أو النووية الى البيئة الغذائية ، والتي يفترض أن تتخلق بالخلية • وحتى اذا كانت الخلية قادرة على القيام بهذه التفاعلات ولكن بمعدل ضعيف فان اضافة نواتـج هذه التفاعلات الى بيئة النمو يزيد من معدل النمو بدرجة ملحوظة •

ويشاهد هذا بوضوح في بعض الاحياء المجهرية غير ذاتيـة التغـذية التي يمكنها ان تنمو على أملاح الامونيوم كمصـدر وحيـد للنتروجين الا أن اضـافة الاحماض الامينية اليها يزيد كثيرا معدل نموها ، وكما سبق أن بينا ان القدرات الوظائفية للجهاز الخلوي تعتمد كلية على ظروف التغذية اثناء النمـو ، ويعلل

هذا بافتراض ان البروتين الخلوي يتكـون من مصدر عـام من الاحماض الامينية Common amino acid pool ٠ وعندما تقل كمية هذا المصدر نتيجة لقلة تكون الاحماض الامينية من الامونيا ، فان أول ما يتخلق في الخلية من بروتينات هـو البروتين الانزيمي الاكثر أهمية من الناحية الحيـوية للخليـة ، أمـا اذا توفـر مصدر الاحماض الامينية بالخلية وذلك باضافة مزيد منها الى بيئة النمو ، فـان الخلية تكون محتوية على كمية كافية من البروتين الانزيمي ، وبالتالي يمكن للخلية ان تقوم بالعمليات التخليقية الاكثر أهمية مثل تكوين البروتوبلازم وحدوث الانقسام بالاضافة الى تكوين الانزيمات الاخرى الاقل اهمية من ناحية بقائها مثل الانزيمات التطبعية ٠

6. مصدر العناصر المعدنية Mineral source

بالرغم من توفر مصادر الطاقة والكربون والنتروجين للخلية الميكروبية فانها لا تستطيع النمو في حالة الغياب الكلي للعناصر المعدنية ويرجع ذلك الى ضرورة وجود العناصر المعدنية لتنشيط الكثير من التفاعلات الايضية والى وظيفة المركبات الفوسفاتية في توليد وتخزين الطاقة والى دخول المعادن في التركيب البنائي لعدد من المكونات البنائية في الخلية ٠

ومن السهل تقدير احتياجات الخلية الميكروبية من الكبريت والفوسفور والتي تحتاجها الخلايا بكميات أقل من المواد الغذائية الاساسية الاخرى ، لذلك يجب ان تحتوي البيئات الغذائية على مصدر كل من هذين المعدنين ، الا ان الاحتياجات من العناصر الاخرى يصعب تقديرها والتعرف عليها اذ ان الكميات اللازمة للخـلايا ضئيلة جدا لا تزيد عن التي تتواجد كملوثات للاوعية الزجاجية أو في الماء المقطر أو في املاح الامونيوم أو الفوسفات التي تضاف الى البيئة ٠

وعلى أساس الوظائف الفسيولوجية للعناصر المعـدنية فان خـلايا الاحيـاء المجهرية وكغيرها من الخلايا تحتاج بالدرجة الرئيسة الى وجود عناصر الصوديوم ، والبوتاسيوم ، والكالسيوم ، والمغنيسوم ، والفوسفور والكبريت وأحيانا الكلور ٠ كما تحتاج هذه الخلايا الى وجود كميات بسيطة جدا من بعض العناصر التي تلعب دورا هاما في الكثير من التفاعلات الانزيمية في الخلية ومثل هذه العناصر النادرة

الحـديد ، والمنغنيز ، والنحاس ، والزنـك ، والكوبلت ، Trace elements والمولبيدنوم والبورون •

وتختلف الوظائف التي تؤديها العناصر المعدنية للخلية ، فالكبريت مثـلا يدخل في تركيب بعض الاحماض الامينية مثل السستايين Cysteine والميثيونين Methionine ، كما ان الكبريتات التي تحتاجها بعض الاحياء المجهرية غير ذاتية التغذية يمكن الاستعاضة عنها ببعض المركبات الكبريتية العضوية • وتعد المركبات الفوسـفورية اساسـية في تحولات الطاقـة ، وبعض المركبات الفوسـفورية والفوسفولبيدات تعتبر ذات أهمية في عمليات تخزين الدهون بالخليـة ، وكذلك الحال بالنسبة لبقية العناصر المعدنية الاخرى •

7. عوامل النمو Growth Factors

عرفت عوامل النمو بطرق مختلفة ، مثلا هي تلك المركبات العضوية اللازمة للنمو والتي يجب ان تكون موجودة بكميات ضئيلة جدا • وفي هذه الحالة تكـون عوامل النمو مرادفة للفيتامينات Vitamins. • وقـد اعطيت تعاريف أخـرى لعوامل النمو منها ، أي مادة ضرورية للنمو ، أو أي مركب عضوي ضروري للنمو • وبالتالي سنستخدم التعبير الاخير محتفظين باسم الفيتامينات للمركبات العضوية أو عوامل النمو الضرورية بكميات صغيرة جدا فقط • وهذه المواد لا تتطلبها الخلايا لانتاج الطاقة أو لبناء مكونات بروتوبلازمها ، بل هي ضرورية لعمل كثير من الانزيمات التي تقوم بكثير من التفاعلات البنائية في الخلية •

ومن المعروف أن ضرورة اضافة فيتامين ما الى بيئة نمو سلالة ميكروبية معينة لا تستطيع النمو بدونه يعني ان هذه السلالة لا تقدر على تخليق هذا الفيتامين ، الا انه قد ثبت أيضا ان لوجود الفيتامين في البيئة الغذائية للسلالات الميكروبية التي تستطيع أن تخلقه تأثيرا منشطا للنمو بدرجة ملحوظة •

ان دراسة تأثير الفيتامينات أو عوامل النمو على نمو الاحياء المجهرية قد وفرت طريقة مفيدة في السنوات الاخيرة لاكتشاف فيتامينات جديدة وكذلك لمعرفة الوظائف الحيوية لمختلف الفيتامينات •

وقـد تم توضيح الدور الوظيفي لبعض الفيتامينات التابعـة لمجموعة B

(B- Complex Vitamins) بانها تعمل كمشاركات انزيمية Coenzymes للعديد من الانزيمات التي تتكون وتعمل في خلايا كل من الاحياء المجهرية والنباتية والحيوانية ٠ والفيتامين المعين قد يعمل كمشارك انزيمي لعديد من الانزيمات التي تساعد في تفاعلات خلوية مختلفة ٠

ولاظهار الطريق الذي يمكن للخلية اتباعه في تكوين نظام انزيمي كامل ، فمن ناحية نجد ان الخلية تخلق عدة أحماض امينية ترتبط ببعضها لتكون الجزء البروتيني من الانزيم ، ومن الناحية الاخرى نجدها تقوم بتخليق الفيتامين وما يتبع ذلك من تفاعلات لتحويله الى مشارك انزيمي ٠ كما أن تركيب الفيتامين يبقى ثابتا بدون تغيير اثناء عملية التحويل ٠ فاذا افترضنا أن نوعا من الاحياء المجهرية لا يقدر على تجهيز الفيتامين أو لا يقدر على تحويله الى مشارك انزيمي او أنه قد يقوم ببعض خطوات هذه التفاعلات فمن المتوقع عدم حدوث نمو في البيئة الا اذا أضيف اليها الفيتامين أو المشارك الانزيمي ٠

ومكان توقف التفاعلات التخليقية للفيتامينات تختلف باختلاف السلالة الميكروبية ٠ فحينما نجد أن بعض السلالات الميكروبية تتوقف بها هذه التفاعلات عند الخطوات المبدئية من التخليق ، نجد ان البعض الاخر منها تتوقف به التفاعلات عند خطوات متقدمة من تخليق الفيتامين ٠

وفي معظم الحالات تستخدم الاحياء المجهرية الفيتامينات وهي على حالة مشاركات انزيمية ببطء شديد عندما تتوفر في بيئة النمو كمادة غذائية ، ويرجع ذلك الى أن حالة المشارك الانزيمي من الفيتامين ما هي الا المشتقة المفسفرة Phosphorylated derivative التي يصعب مرورها خلال الاغشية السايتوبلازمية ، وهناك بعض الحالات القليلة الشاذة تستخدم فيها الحالة المفسفرة من الفيتامين بدرجة اكبر من الفيتامين نفسه ويرجع ذلك الى عدم قدرة مثل هذه الخلايا على تحويل الفيتامين الى مشارك انزيمي ٠

ويمكن تلافي حاجة الخلية من الفيتامين أو من المشارك الانزيمي اذا أضيف الى بيئة النمو ناتج تفاعل الانزيم الذي يعمل ذلك الفيتامين كمشارك له ٠ وهنا

تكون كمية ناتج التفاعل اللازم اضافتها اكبر بكثير من كمية الفيتامين الذي تعرضه •

وكثير من الفيتامينات مثل حامض النيكوتنيك Nicotinic acid والرايبوفلافين Riboflavin والتي تعمل في عمليات نقل الهيدروجين وفي نظم انتاج الطاقة تكون لها وظائف متعددة ومرتبطة بالخلية بحيث لا يمكن لاي مادة كيمياوية أن تحل محلها •

والفيتامينات الاخرى مثل البيريدوكسين (B_6) Pyridoxine وحامض الفوليك Folic acid والسيانوكوبالامين (B_{12}) Cyanocobalamine يمكن الاستعاضة منها في بعض الاحياء باضافة مركبات أخرى • والفكرة كما سبق بيانها أن الفيتامين في هذه الحالة يعمل كمشارك انزيمي في بناء المركبات التي يمكن ان تحل محله في تنمية الكائن الحي المجهري • فمثلا يمكن الاستعاضة عن البيريدوكسين باضافة الاحماض الامينية في بيئة نمو بكتريا حامض اللاكتيك • اذ أن الحالة المفسفرة من هذا الفيتامين (المشارك الانزيمي) Pyridoxal phosphate قد ثبتت اهميتها في عمليات تخليق الاحماض الامينية في الخلايا البكترية •

فعند دراسة فيتامين (عامل نمو) جديد تتبع الخطوات التالية عادة لاثبات أهميته لنمو الخلية الميكروبية التي تختلف عن طرق دراسة المواد الغذائية الاخرى :ـ

1. تعيين الاحتياج الغذائي من المواد الطبيعية التي تحتوي على عامل النمو •
2. العزل والتعرف على العامل المعين والذي تتطلبه الخلايا بالمواد الطبيعية •
3. دراسة لحصر المواد التي يمكن استبدالها بعامل المعزول Metabolite replacement
4. دراسة الوظائف التي يؤديها عامل النمو المعزول للخلية Functional studies

ان غياب فيتامين أو حامض اميني من البيئة قد لا يؤدي الى ايقاف النمو كلية فمثلا عند غياب فيتامين معين فان الكائن الحي المجهري يمكنه ان يقوم بكل الخطوات التي تؤدي الى تخليقه ولكن قد يتم واحد او أكثر من هذه التفاعلات على معدل بطيء نسبيا • وفي هذه الحالة تكون اضافة الفيتامين بمثابة منشط للنمو Stimulant منه كمادة غذائية اساسية Essential nutrient.. • أو أن كمية الفيتامين التي يكونها الكائن الحي المجهري تكون غير كافية لتحضير المشارك الانزيمي الكافي للتفاعلات الخلوية •

وكمية الفيتامينات التي تخلقها الخلايا أو تمتصها من البيئة لا تكون عادة محدودة بالكمية التي تحتاجها الخلية منها اذ أن الخلايا تكون كميات من الفيتامينات تزيد كثيرا عن حاجتها وفي هذه الحالة تستخدم هذه السلالات في الانتاج التجاري لهذه الفيتامينات ٠ وقد امكن انتاج فيتامين الرايبوفلافين B_2 والسيانوكوبالامين (B_{12}) تجاريا من نواتج التخمرات المختلفة التي تتم بواسطة الخميرة والبكتريا على التوالي ٠ وفي مثل هذه الصناعات التخمرية تعدل الظروف البيئية لمزارع هذه الاحياء بطريقة يكون من شانها انتاج اكبر كمية من الفيتامينات ٠

الفصـــل الــرابع

البيئات الغذائية للاحياء المجهرية

Microbial Media

1. مقـــدمة
2. الاعتبارات الهامة في اختيار البيئة المناسبة
3. تركيب البيئات الغذائية
4. البيئات المألوفة في التخمرات الصناعية

1.4. المولاس

2.4 ماء نقيع الذرة

3.4 المحلول الكبريتيتي المتخلف

4.4 الشرش

5.4 مصادر غذائية أخرى



1. مقدمة Introduction

في الواقع ان اختيار بيئة جيدة يعد عاملا مهما جدا لنجاح أي عملية تخمر صناعي كما هو الحال في انتخاب سلالة الميكروب التي تقوم باجراء هذا التخمر . فالبيئة تجهز الكائن الحي المجهري بالمواد الغذائية اللازمة للنمو والطاقة وبناء المادة الخلوية والتخليق الحيوي لنواتج التخمر . وبالاضافة الى المركبات الكربونية والنتروجينية ، فان البيئة تحتوي على الاملاح اللاعضوية ، والماء ، والفتياسينات ، وعوامل النمو الاخرى ، ومولدات Precursors نواتج التخمر ، واوكسجين مذاب وغازات أخرى ، ومنظمات الحموضة ، ومضادات الرغاوي ، ومتحلل Lysate الخلايا الميتة ، ونواتج التخمر . جميع هذه المواد السابقة الذكر تعد مواد مغذية ، وعلاوة على ذلك ، قد تحتوي البيئة ايضا على مثبطات مختلفة لنمو الاحياء المجهرية وتخليقها الحيوي ، واذا كانت البيئة غير معقمة ، فقد تحتوي حتى على الانزيمات النشطة المضافة كمكونات مميزة من بين مكونات البيئة .

وقد يؤدي الاختيار غير الجيد لمكونات البيئة الى نمو خلوي محدود ونواتج تخمر قليلة . كما أن البيئة الفقيرة تقدر ان تغير انواع ونسب النواتج التي يقوم الكائن الحي المجهري بتخليقها . لذا فان أنواع وكميات المكونات الغذائية للبيئة تعد من العوامل المحددة والهامة لنجاح عملية التخمر الصناعي .

2 . الاعتبارات الهامة في اختيار البيئة المناسبة

تعتمد نوع البيئة المستخدمة على عدة متغيرات متبادلة العلاقة منها :

اولا ـ الكلفة وسهولة تقييس المكونات الفردية تكون ذات أهمية رئيسية فالمادة الاولية الخام المناسبة تكون قليلة الاستعمال اذا كان التجهيز العالمي لها محدودا جدا ، وكذلك المنتجات المتخلفة الغزيرة تكون غير مرغوبة بدرجة متساوية اذا كانت غير قادرة على أن تفي بمواصفة قياسية .

ثانيا ـ النسبة المئوية لتركيب المادة الاولية الخام ، خصوصا تلك الغنية بالنتروجين والكربون . فالمادة الاولية المحتوية على نسبة كبيرة من السليلوز لها استخدام صناعي ضيق ، بسبب قلة الاحياء المجهرية التي تظهر نشاطا على السليلوز .

ثالثا ـ من المهم جدا ربط مكونات البيئة بنوع المنتوج المراد انتاجه • وعلى سبيل المثال ، فيتامين B_{12} يحتوي على الكوبلت وبالتالي فان بيئة التخمر يجب ان تجهز هذا العنصر • ونفس الشيء فان الكلوريد يجب ان تتضمنه البيئة المستخدمة لانتاج المضادات الحيوية المحتوية على الكلور كالكلوروتتراسيكلين والكريزيوفولفين Griseofulvin وأيضا يجب توفر حامض فنيل أستيك في البيالبيئة كمولد عند انتاج بنزيل بنسلين (بنسلين G) •

رابعا ـ ان فسيولوجية الكائن الحي المجهري المستخدم في تخمر معين تحدد بعض مستلزمات مكونات البيئة • فسلالات الخميرة **Saccharomyces cerevisiae** تستخدم السكريات الهكسوزية فقط ، في حين خمائر أخرى مناسبة لاغراض الغذاء او العلف لا تكون بمثل هذا التحديد في مصدر كربونها • وتفضل معظم الفطريات بيئة تحتوي على مصادر نتروجينية سهلة التمثيل (مثل ماء نقيع الذرة) ، في حين الاكتينومايسيتات تفضل مصادر نتروجينية غير متيسرة بسهولة (مثل : مسحوق فول الصويا Soybean meal) •

خامسا ـ واخيرا يجب ان يعطى اهتمام لتوازن مكونات البيئة على سبيل المثال ، في انتاج ال Griseofulvin الذي يكون فيه التركيز الامثل للنتروجين متعلقا بطبيعة الكربوهيدرات المستخدمة •

قد يمر تكوين نواتج التخمر بطورين هما ، طور نمو الكائن الحي المجهري وطور ظهور الناتج بواسطة الخلايا الناضجة • ونادرا ما تكون البيئة والظروف المحيطة اللازمة متماثلة لكل من العمليتين ، على الرغم من ان الكائن الحي المجهري نفسه قد يغير في بعض الاحيان من الظروف خلال طور النمو لتكوين ظروف بيئية مناسبة لتكوين الناتج •

ويكون معدل نمو الكائن الحي المجهري محددا بعدد الخلايا الموجودة ، وبمعدل نموها الخاص واخيرا بتركيز اي مادة تفاعل محددة • ويكون معدل تكوين الناتج مشابها لفعل الانزيم على مادة تفاعله :

[Enzyme]+[Substrate] $\rightleftharpoons$ [Enzyme-Substrate Complex] ...... (1)

[Enzyme-Substrate Complex] $\rightarrow$ [Enzyme] + [$Product_1$] + [$Product_2$]....(2)

ان معدل تفاعل لاي تركيز معين من الانزيم يعطى بمعادلة بريجز ـ هالدن Briggs-Haldane او معادلة ميكيلس Michaelis :

حيث v هو معدل سرعة التفاعل ، V هو السرعة القصوى للتفاعل مع مادة تفاعل غير محددة ، K_m هو التركيز الجزيئي لمادة التفاعل و K_m هو ثابت ميكيلس (ويكافيء تركيز مادة التفاعل التي تعطي نصف السرعة القصوى) ويساوي ثابت تفكك معقد الانزيم ـ مادة التفاعل (وعادة بترتيب قدره 10^{-3}Molar)

ويتناسب معدل التفاعل مع معدل اختفاء مادة التفاعل (dS/dt) ، وهذا بدوره يتناسب مع معدل تكوين الناتج (dP/dt) . وفي أي تفاعل فان السرعة النهائية قد يشار اليها بانها ثابت (k)، ولكن تركيز الانزيم سيتناسب مع العدد الكلي للخلايا (x) المنتجة للانزيم ، وبالتالي :ـ

$$V = Kx \frac{S}{S+K_m}$$

واذا كانت قيمة K_m صغيرة بدرجة كافية بحيث يمكن اهمالها فانها تسهل التقريب التالي :

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{dp}{dt} = kx$$

وبالتالي في ظروف بيئية معينة فان معدل تكوين الناتج من مادة تفاعله يعتمد على تركيز الخلايا ، والناتج سيكون محددا بالمدى الذي به تؤثر المسارات البديلة لتكوين النواتج الثانوية ٠

ان جميع تخمرات الدفعة الواحدة Batch fermentations تكون معرضة لتعاقب العوامل المسيطرة ٠ وخلال فترة النمو أو تطور الكائن الحي المجهري ، يتم تجهيز البيئة بدقة بالنتروجين والكربون ، ولكن حجم الخلايا الناتجة يتحدد بدرجة كبيرة بواسطة درجة التحريك والتهوية ٠ وخلال طور تكوين الناتج فان عددا من العوامل المختلفة قد تتحكم بالناتج منها : النتروجين المحدود قد يزيد من ناتج تخمر Griseofulvin ، والنقص الشديد في التهوية قد يكون ضروريا لاعلى ناتج في تخمر الايثانول ، والزيادة في الفوسفات قد تخفض من الناتج في تخمر الستربتومايسين ٠

وبطريقة مماثلة ، فـأن لـ pH سائل التخمر تأثير كبير في الحاصل من الناتج ٠ فالاكيتنومايستيات (خصوصا Streptomyces grisens) تفضل قيم pH بين 8, 6 لكلا النمو وانتاج المضاد الحيوي ، ولكن الفطريات الراقية (مثال Penicillium chrysogenum) ، على الرغم من قدرتها على النمـو

بصورة جيدة على 5.0 pH ، فانها تفضل pH بين 6.5 — 7.5 لانتاج المضاد الحيوي ٠

ويتداخل التحريك والتهوية ليمارسا تأثيرا في التراكيز المثلى للمكونات فالمستوى الامثل من النتروجين في تخمر محدود النتروجين قد يكون في بعض الاحيان مرتبطا بصورة مباشرة مع درجة التحريك او التهوية ، ولكن الاخير يكون محددا بدوره بزيادة الـ Thixotropic nature لسائل التخمر المسبب بواسطة الزيادة في حجم الخلية ٠ وهكذا فان التخمرات تكون محكومة بعلاقات معقدة ٠ ومن بينها تركيز النتروجين في البيئة ، وتصميم المخمر ، ودرجة التحريك أو التهوية ، وعدد الخلايا الناتجة لكل وحدة حجم ٠

3. تركيب البيئات الغذائية Media Composition

قد يتفاوت التركيب الخاص لبيئة التخمر من بسيط الى معقد تبعا لنوع الكائن الحي المجهري وكذلك تبعا لتخمره ٠ فالاحياء المجهرية الذاتية التغذية تحتاج الى بيئات غذائية لا عضوية بسيطة ٠ وهذه الاحياء تحتاج الى قليل من الاملاح اللا عضوية ، والماء ومصدر النتروجين ، في حين تستوفي احتياجاتها من الكربون بواسطة ثاني أوكسيد الكربون الجوي أو بواسطة الكربونات ٠ وعليه ، فمن مواد غذائية لا عضوية بسيطة تقدر الاحياء المجهرية الذاتية التغذية على تخليق كل المركبات العضوية المعقدة اللازمة لابقاء الحياة ولتسمح بنمو وتكاثر خلاياها ، وهي تستوفي احتياجاتها من الطاقة الكلية عن طريق اكسدة بعض المكونات اللاعضوية المعنية لبيئاتها ٠

وفي الطرف المعاكس لهذا المقياس تقع الاحياء المجهرية الصعبة التنمية جدا Highly fastidious ، مثل بعض من بكتريا حامض اللاكتيك التي تنقصها القدرة على تخليق الكثير من احتياجاتها للمعيشة والنمو ٠ هذه الاحياء تحتاج الى وجود انواع عديدة من المواد الغذائية المصنعة البسيطة والمعقدة في البيئة ، وكذلك يجب ان يكون لها امداد من الكربون العضوي للاستفادة منه في تخليق المادة الخلوية ولتحرير الطاقة الايضية ٠

هذان هما الطرفان النقيضان ومن الواضح ان هناك احياء مجهرية تتواجد باحتياجات غذائية تتوسط بين الطرفين ٠

وتقسم البيئات الغذائية البسيطة والمعقدة الى فئتين هما :

البيئـة التركيبية او التخليقية Synthetic medium والبيئـة الخـام Crude medium ٠ ويتضح من اللمحة الاولى ان البيئـة التركيبية هي بيئـة اختيار او تفضيل ، وهي البيئة التي تكون جميع مكوناتها معروفة على وجـه الخصوص ٠ وكل مكون عبارة عن مركب نقي نسبيا وتكون الكميات الدقيقة منه والمشتركة في البيئة معروفة أيضا ٠ وكمثال من البيئة التركيبية هي تلك المحتوية على أمـلاح عضـوية ، وسكر نقي ومركب أمونيوم أو نترات أو حامض أميني للامداد بالنتروجين المرتبط ٠ ومن الجلي انه اذا كان الاحتياج للنتروجين مستوف بشيء كالدم المجفف مثلا ، الا اننا لا نعرف المكونات الدقيقة وكمياتها في البيئة ٠

وتظهر البيئة التركيبية ميزات واضحة لبعض الانواع من الدراسات ، ولطالما ان كمية كل مكون وتركيبه الكيمياوي تكون معروفة ، فان تركيز اي مكون أو عدة مكونات يمكن ان تتفاوت بسهولة لتقدير تأثيره الخاص او النوعي في نمو الخلية وكمية الناتج ٠

وكذلك فمن السهولة بمكان حذف أو اضافة المكونات الفردية ٠ وتسـمح هذه الاعتبارات بدراسة العمليات الايضية التي تؤدي الى عملية تكوين الناتـج والتحكم فيها ٠

ونظرا لكون البيئة التركيبية معروفة جيدا ، فانها تساعد في الحصول على تكرارية في النمو وفي كمية الناتج من عملية تخمر واحدة الى أخـرى بحيث ان الخطأ العائد الى تركيب البيئة يبقى في الحدود الدنيا ٠

وعادة لا يعد تكوين الرغاوي مشكلة في البيئات التركيبية ، لكونها لا تحتوي اي بروتين او ببتيدات عالية نسبيا في الوزن الجزيئي ٠ وتكون عمليات استرجاع وتنقية نواتج التفاعل بسيطة نسبيا في مثل هذه البيئات ، وذلك لعدم جـود مركبات عضوية غريبة ضمن البيئة وكذلك لكون أغلب المركبات التي قد اخل مع استرجاع الناتج معروفة ٠

وبالرغم من هذه المميزات ، فان البيئات التركيبية تكون قليلة الاسـ صناعيا لارتفاع تكاليف مكوناتها النقية بالنسبة الى النواتج المتحصل عليها ٠

من الناحية الاخرى فان البيئة البديلة هي البيئة غير التركيبية أو الخـام

Crude medium والتي لا تعطي دائما حاصلا اكبر من نواتج التخمر بالمقارنة مع البيئة التركيبية • وكمثال على البيئة الخام هي تلك المحتوية على مسحوق فول الصويا Soybean meal ، والمولاس الناتج من مصانع صناعة السكر الخام Blackstrap molasses ، وماء نقيع الذرة Corn steep liquor ، وكبريتات الامونيوم وكربونات الكالسيوم وفوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين وايضا قد تمد بالمواد المولدة لعملية التخليق الحيوي لناتج التخمر ، وقد تسمح باستخدام العوامل المانعة للرغاوي بدون تغيير جوهري في التوازن الغذائي للبيئة • وعليه تحتوي البيئات الخام على مصادر خام أو غير معروفة تماما من المواد المغذية وبالتالي فانها توفر زيادة من كلا المواد المغذية وعوامل النمو •

ويفترض ان لا تحتوي هذه البيئة على معادن واملاح لا عضوية او مركبات عضوية سامة للكائن الحي المجهري أو لتكوينه للناتج • وكذلك يفترض ان تكون مصادر الكربون والنتروجين الخام في مثل هذه البيئة بصورة يمكن للكائن الحي المجهري استخدامها • وكمثال ، فان هذه البيئة لا يجوز ان تجهز سكرا خماسيا لكائن حي يستخدم السكر السداسي فقط ، أو بروتين لكائن حي ليس له نشاط بروتيوليتي ، أو نشا لكائن حي تنقصه انزيمات الاميليزات •

وأحيانا ينبغي ان تفي البيئات الخام ، والى بعض المدى البيئات التركيبية ، باحتياجات النمو وتكوين الناتج اضافة الى تجهيز المواد المغذية • وتشمل هذه الاحتياجات السمة البفرية ، والعجز في تكوين الرغاوي ، والسيطرة على جهد الاكسدة والاختزال ، ومعادلة نواتج النمو الحامضية او القلوية ، والاسهام في الحفاظ على الثبات الوراثي للكائن الحي المجهري ، وتشجيع التهوية والتحريك الشديدين ، والسماح باسترجاع ناتج التخمر دون اللجوء الى طرق استرجاع معقدة ، ومقاومة التعقيم بدون حدوث تفاعلات عكسية للمكونات الغذائية ، والسماح لنمو الكائن الحي بحالته المورفولوجية الملائمة ، واستمدادا مسبقا للمواد المولدة اذا لزم الامر ، والسماح بتكوين السبورات أو منعها ، واستمدادا مسبقا للمثبطات الايضية الخاصة عند الحاجة • وبالاضافة الى ذلك ينبغي ان تكون البيئة مناسبة من الناحية الاقتصادية للتخمر المعين •

وبغض النظر عن مصادر مكونات البيئة فان الاحتياج الرئيس هو أن تكون هذه المواد المغذية رخيصة • وعلى هذا الاساس تعد النواتج الثانوية للعمليات الزراعية ارخص مصدر لمكونات البيئة وخاصة من ناحية مصدر الكربون • وتتوفر في الطبيعة مصادر غنية ومختلفة للكربون والنتروجين وبقية المواد الغذائية الاساسية الاخرى ، سواء كانت هذه المواد منتجات أولية أو ثانوية للعمليات الزراعية أو الصناعية •

ومن المصادر الكربونية هي الكربوهيدرات البسيطة والمعقدة ، وتشمل الكحولات السكرية أو الكحولات الاخرى ، والاحماض العضوية ، والبروتينات ، والببتيدات ، والاحماض الامينية وحتى الهيدروكربونات •

ومن المصادر الخام للسكريات البسيطة هي مولاس البنجر والقصب ، ومولاس الذرة (هيدرول Hydrol) ، والشرش ، والمحلول الكبريتي المتخلف عن صناعة الورق Sulfite waste liquor ، ونفايات الفواكه ، ومخلفات معامل التعليب وما يشابه ذلك • ومن السكريات المتعددة كالنشا هي تلك المجهزة بواسطة الذرة ، والحنطة ، والشيلم ، والرز ، والبطاطا ، والبطاطا الحلوة ومنتجات زراعية أخرى ويمكن أيضا استخدام النواتج الثانوية السليلوزية كمصادر كربونية الا انها تحتاج الى عملية تسكير مكلفة كالتحليل بالحامض ومن الامثلة على هذه المواد المحتوية على 50% سليلوز هي :ـ مخلفات الخشب ، وقشور البلوط ، وقوالح الذرة والقش •

أما المصادر النتروجينية ، فقد تضاف الاملاح النتروجينية اللاعضوية حتى الى البيئات الخام لايفاء احتياجاتها من النتروجين لاغراض النمو •

وتعد المواد النتروجينية النباتية والحيوانية مصادر رئيسة للنتروجين في هذه البيئات • ومن الامثلة على هذه المصادر : ماء نقيع الذرة ، والمواد المذابة والناتجة من معامل التقطير ، والكازين ، والحبوب ، والببتونات ، ونفايات المسالخ ، ومسحوق السمك Fish meal ومسحوق فول الصويا Soybean meal وطحين بعض المحاصيل الزيتية •

ان العديد من المصادر الغذائية الخام الجيدة لبيئات التخمر هي نفسها مخاليط معقدة من المواد الغذائية المجهزة للمركبات الكربونية والنتروجينية بالاضافة

الى عوامل النمو • وسنذكر أهم الامثلة على البيئات المستخدمة في عمليات التخمر الصناعي •

4. البيئات المألوفة في التخمرات الصناعية

1.4. المولاس Molasses

المولاس هو الناتج الثانوي لصناعة السكر من البنجر أو القصب • والمولاس هو ذلك الشراب المركز Concentrated syrup أو الشراب الام Mother liquor المتحصل عليه في اي خطوة من خطوات عملية تكرير السكر ، ويعطى اسماء مختلفة تبعا لخطوة التصنيع المأخوذ منها •

ومن أنواع المولاس المستخدمة في التخمرات الصناعية ، المولاس الناتج من مصانع صناعة السكر الخام Blackstrap molasses وهذا يحضر عادة من قصب السكر ويعد من أرخص وأكثر المصادر السكرية استخداماً في التخمرات الصناعية • ففي الانتاج التجاري للسكر ، يركز العصير الناتج من هرس قصب السكر وذلك للسماح لعملية تبلور السكروز • ثم تنفصل البلورات السكرية من الشراب الام الذي يركز مرة أخرى لاسترجاع كمية اضافية من السكر المتبلور • وتكرر هذه العملية عدة مرات الى ان تتجمع مثبطات التبلور الى تركيز معين بحيث يكون استرجاع السكروز غير اقتصادي • عند ذاك يكون الشراب الام (أو الاساس) لا يزال محتويا على حوالي 52% سكريات كلية محسوبة على اساس 30% سكروز و 22% سكريات محولة ويعرف هذا الشراب باسم Blackstrap molasses • وعندما يستخدم هذا المولاس كاحد مكونات بيئة التخمر يكون محويا على 50% سكريات قابلة للتخمر •

أما النوع الثاني فهو المولاس الناتج من مصانع تكرير السكر الخام Refinery Blackstrap molasses وهو منتوج مشابه للسابق ولكنه يختلف عنه بكونه ناتج بعد اعادة بلورة السكر الخام أثناء عملية تكريره لانتاج السكر الابيض النقي •

والنوع الثالث هو المولاس عالي الاختبار أو المحول High-test or invert molasses ويحوي على 70 — 75% سكر وينتج بطريقة مختلفة

عن النوعين السابقين • حيث يحول كل عصير القصب جزئيا لمنع بلورة السكر ، أي ان السكروز يحلل جزئيا الى سكريات احادية باستخدام الحرارة والحامض ثم يعادل ويركز بدون ازالة أي سكر منه • وينتج هذا المولاس فقط في السنوات المتميزة بوفرة الانتاج من قصب السكر ، وعليه قد يصبح تيسره في أي وقت موضعا للتساؤل •

أما مولاس البنجر فانه ينتج بطرق مشابهة لانتاج مولاس القصب • ويكون مولاس البنجر محدودا في محتواه من البيوتين Biotin (عامل النمو المهم للخميرة) ولذلك فان كمية صغيرة من مولاس البنجر أو أي مصدر للبيوتين تضاف كعامل نمو لهذه الاحياء المجهرية •

ومولاس الذرة الذي يدعى هيدرول Hydrol هو المولاس الناتج من صناعة الديكستروز المتبلور من نشا الذرة • اذ يحتوي على 60% سكريات ولكنه يحتوي على تركيز ملحي عال نسبيا يجب وضعه في الاعتبار اذا أريد استخدامه كأحد مكونات بيئة النمو •

وبالاضافة الى احتواء مولاس القصب أو البنجر على السكروز والسكر المحول فانه يحتوي على مواد كربوهيدراتية وغير كربوهيدراتية عديدة ومختلفة • وكذلك يحتوي على مواد نتروجينية بسيطة ومعقدة ، واحماض عضوية ، وعوامل نمو وفيتامينات ، واملاح لا عضوية خصوصا الكالسيوم والفوسفور وغيرها من الكايتونات والانيونات •

ان مولاس القصب ومولاس البنجر يختلفان كثيرا في تركيبها من عام لاخر ومن منطقة جغرافية الى أخرى وكذلك تؤثر العمليات التصنيعية كثيرا في التركيب الكيمياوي للمولاس ، لذلك قبل القيام باجراء عملية التخمر الصناعي تجري التجارب للتأكد من صلاحية المولاس المستخدم في الانتاج وقابلية الاحياء المجهرية على اعطاء نمو جيد فيه للحصول على اكبر كمية ممكنة من الناتج •

2.4. ماء نقيع الذرة Corn steep liquor

يعد ماء نقيع الذرة منذ زمن طويل مادة مضافة طبيعية مفيدة للبيئة التركيبية لتشجيع نمو الاحياء المجهرية أو لزيادة كمية المنتج من النواتج المرغوبة • وماء نقيع

الذرة هو المستخلص المائي الثانوي الناتج من نقع الذرة خلال الانتاج التجاري لنشا الذرة والجلوتين ومنتجات الذرة الاخرى . اذ يركز ماء النقع المتخلف الى حوالي 50% جوامد كلية ويعرف هذا المركز بماء نقيع الذرة ، حيث يستخدم في صناعة المواد العلفية وكبيئة مساعدة في صناعة التخمر .

وقد استخدم بكثرة في البداية كبيئة تخمر في صناعة البنسلين . ومن هذه الـ 50% جوامد في ماء نقيع الذرة ، يشكل حامض اللاكتيك حوالي نصفها . أما الباقي فيشمل الاحماض الامينية ، والجلوكوز وسكريات مختزلة أخرى ، والاملاح ، والفيتامينات ، والمولدات مثل تلك اللازمة لجزيئة البنسلين . وهذه النسبة العالية من حامض اللاكتيك تتكون خلال الصناعة نتيجة نمو بكتريا حامض اللاكتيك والمايكودرمات (المكونة للغشاء السطحي) والفطريات الشبيهة بالخميرة . اي ان حامض اللاكتيك ليس أحد مكونات الذرة وانما ينتج من التخمر الطبيعي لماء نقيع الذرة بواسطة هذه الاحياء ، ثم تقتل الاخيرة عندما يركز المحلول بالحرارة . وبسبب هذه الطبيعة الحامضية لماء نقيع الذرة فان استخدامه في بيئات النمو يتطلب وجود كربونات الكالسيوم بنسبة معينة وذلك لتهيئة pH مناسب لنمو الكائن الحي المجهري للقيام بعملية التخمر . ويختلف ماء نقيع الذرة في تركيبه من وجبة تصنيع لاخرى ، وقد يؤدي هذا الاختلاف الى تكرارية غير دقيقة في التخمرات الصناعية . لذلك من الضروري تقدير مكونات هذا المحلول وخصوصا المكون ذا الاهمية المباشرة للعملية التخمرية (مثل حامض أميني معين أو فيتامين والخ) لمعرفة المستوى الخاص بذلك المكون الموجود في كل وجبة من وجبات ماء نقيع الذرة المستخدمة في عملية التخمر .

3.4 المحلول الكبريتيتي المتخلف Sulfite waste liquor

ان هذا المحلول الكبريتيتي يتخلف من صناعة لب الورق من الخشب بعد هضم الاخير لتحويله الى لب سليلوزي وذلك بواسطة بيكبريتيت الكالسيوم Calcium bisulfite باستخدام الحرارة والضغط ، ويشكل التخلص من هذا المحلول المتخلف مشكلة كبيرة لمصانع الورق لكونه يؤدي الى مشاكل خطيرة وجدية في تلوث البيئة . وقد تصل BOD لهذا المحلول الى 25000 — 50000 ملغم لكل لتر . وتؤدي الطريقة المألوفة في التخلص منه في الجداول والانهار الى تلوث مياهها،

وقد سنت العديد من الدول قوانين للحد من استخدام هذه الوسيلة من وسائل التخلص من فضلات المصانع ٠ وتشكل الليجنوسلفونات Lignosulfonate حوالي 20% من المادة العضوية للمحلول في حين تؤلف السكريات الاحادية حوالي

منه ٠ لذلك يمكن استخدام هذا المحلول كبيئة تخمر مخففة في انتاج الكحول الصناعي بواسطة الخميرة **Saccharomyces cerevisiae** وفي انتاج بروتين الخلية الواحدة Single Cell Protein وذلك بواسطة تنمية الخميرة **Candida utilis** واستخدام الناتج في تغذية الحيوانات ويحتوي المحلول الكبريتيتي المتخلف على 10 — 12% جوامد تشكل السكريات حوالي 20% اي انه يحتوي على 2% سكر تقريبا ٠ وتشمل هذه السكريات الهكسوزات مثل D-جلوكوز ، و D,-جالاكتوز ، و D ٠ مانوز والبنتوزات مثل D, زايلوز و L — ارابينوز ٠ ومع ذلك فان الكميات النسبية في هذه السكريات الموجودة في المحلول الكبريتيتي المتخلف تعتمد لدرجة معينة على الخشب المهضوم ٠ فالخشب الطري يكون عاليا في محتواه في الهكسوزات في حين يكون الخشب الصلب عاليا في محتواه من البنتوزات ٠ وهذه النقطة مهمة جدا بالنسبة لنوع الكائن الحي المجهري الذي يستخدم في التخمير ، فسلالة الخميرة **Saccharomyces cerevisiae** تستخدم فقط الهكسوزات في حين يمكن لسلالة الخميرة **Candida utilis** أن تخمر كلا من الهكسوزات والبنتوزات ٠

وفي اية حالة وبغض النظر عن نوع الكائن الحي المجهري فان سكريات هذا المحلول لا يمكن أن تتخمر مباشرة ، لانه ينبغي ازالة ثاني اوكسيد الكبريت الحر او حامض الكبريتوز منه اولا قبل اجراء التخمر ٠ وعملية الازالة تكون بطريقتين، اما بواسطة الانتزاع بالبخار Steam stripping او بواسطة المعادلة والترسيب باستخدام الجير او كربونات الكالسيوم ٠

4.4 الشرش Whey

الشرش هو المحلول الذي يتخلف عند صناعة الجبن والكازين ، واغلب هذا المحلول يذهب الى المجاري ٠ وعادة قيمة الـ BOD له حوالي 60000-70000 ملغم / لتر وتأتي هذه اساسا من اللاكتوز الموجود في الشرش ٠ ويستخدم بعض

الشرش في تغذية الخنازير والعجول في حين تستخدم كميات قليلة منه في المشروبات الغذائية • ونتيجة لنمو صناعة الجبن فان حجم الشرش المنتج الذي كان 74 مليون طن في عام 1973 (حسب تقرير منظمة الغذاء والزراعة الدولية عام 1974) قد فاقم مشكلة التلوث • وقد وضعت دول عديدة قوانين جديدة للسيطرة على مشكلة التلوث ولاجبار الصناعة على ايجاد حلول لها • ومن ضمن هذه الحلول استخدام الشرش في بعض الصناعات التخمرية ، مثل صناعة الكحول الاثيلي وبروتين الخلية الواحدة باستخدام بعض الانواع من الخمائر • والجدول (1.4) يوضح التحليل النموذجي للشرش السائل :ـ

الجدول (1.4)

تركيب الشرش السائل

المكون	المحتوى (٪ وزن / حجم)
مـاء	93.1
بروتين	0.9
دهـن	0.3
لاكتوز	5.1
رمـاد	0.6

من منظمة الغذاء والزراعة الدولية (1974)

ويشكل اللاكتوز حوالي 70% من جوامد الشرش والبروتين 15% • ويتواجد حامض اللاكتيك في الشرش بكميات متفاوتة تبعا لطول فترة تخزين الحليب قبل تصنيعه وخصوصا اذا استخدمت بكتريا حامض اللاكتيك في ترسيب الكازين • كذلك يختلف تركيب الشرش تبعا لانواع وطرق تصنيع الجبن •

وقد تجرى بعض المعاملات على الشرش قبل استخدامه كبيئة تخمر وقد تضاف اليه بعض المواد الغذائية الضرورية لنمو الكائن الحي المجهري للحصول على أعلى كمية من الناتج المرغوب •

5.4 مصادر غذائية اخرى Other Food Sources

بالاضافة الى ما سبق ذكره فان العديد من المواد سواء كانت من مصادر

نباتية أو حيوانية تستخدم كبيئات غذائية لنمو الاحياء المجهرية واعطاء نواتج مرغوبة ، وأغلب المواد الزراعية سواء كانت الاولية او الثانوية وكذلك مخلفاتهما تستخدم في التخمرات الصناعية ٠ ومن هذه المواد الاعناب المختلفة (في صناعة النبيذ) ، والشعير (في صناعة البيرة) ، والبطاطا (في صناعة الكحول والمشروبات الكحولية) ، والذرة والقمح ، والرز ، والتمور ، والعديد من الخضراوات والفواكه ٠

كما يتم امداد التخمرات المختلفة بمصادر اضافية من النتروجين والكربون على هيئة أملاح لا عضوية ومركبات عضوية أو حتى في صورة غاز بالاضافة الى ما تحتويه هذه التخمرات في بيئاتها الغذائية من المصادر المختلفة لمتطلبات النمو ٠

والجدول (2.4) يبين المواد الاولية المستخدمة في التخمرات الصناعية ٠

الجدول (2.4)

المواد الاولية المستخدمة في التخمرات الصناعية

(أ) المواد المجهزة للنتروجين

المادة	النسبة		
مسحوق فول الصويا مسحوق الفول السوداني	%8	نتروجين	وزن/وزن
ماء نقيع الذرة مسحوق الشرش	%4.5	نتروجين	وزن/وزن
دقيق الشوفان دقيق الشيلم الشعير مولاس القصب مولاس البنجر	%2.0-1.5	نتروجين	وزن/وزن

(ب) المواد المجهزة للكربوهيدرات

النشا	دقيق الشوفان
	دقيق الشليم
	الشعير
	مسحوق فول الصويا
	مسحوق الفول السوداني
السكروز	السكر الابيض النقي
	السكر البني الخام
	مولاس القصب
	مولاس البنجر
الجلوكوز	الجلوكوز احادي الهدرتة النقي
	النشا المتحلل
اللاكتوز	اللاكتوز النقي
	مسحوق الشرش

كما قد تضاف الى البيئة الغذائية بعض عوامل النمو والفيتامينات من مصادرها الاولية الخام لتعويض النقص فيها بالبيئة علاوة على اسهامها في تنشيط نمو الكائن الحي المجهري لاعطاء الناتج المرغوب ۰ والجدول (3.4) يبين بعض هـــذه المواد المضافة ۰

الجدول (3.4)

عوامل النمو الضرورية لبعض الاحياء المجهرية

عامل النمو الثانوي	الصورة الفعالة	المجموعة الكيمياوية المنقولة	المادة اللازمة للأيفاء بالاحتياجات الأيضية	المادة الأولية الخام مصدر عامل النمو
الثيامين (B_1)	ثيامين بيروفوسفات	ازالة CO_2 ومجاميع الدهيدية متكونة من C_2	(1) بيريميدين . (2) ثيازول (3) بيريميدين + ثيازول (4) ثيامين	بقايا تلميع الرز ، جنين الحنطة ، الخميرة
الرايبوفلافين (B_2)	(1) فلافين احادي النيوكليوتيد	هيدروجين	رايبوفلافين	الحبوب .
	(2) فلافين أدنين ثنائي النيوكليوتيد	هيدروجين		ماء نقيع الذرة
البيرودوكسال (B_6)	بيرودوكسال فوسفات	مجموعة امينو وازالة CO_2	(1) بيرودوكسين (1) بيرودوكسامين أو بيرودوكسال (3) بيرودوكسال فوسفات	ميسيليوم الفطر **Penicillium** المتخلف ، الخميرة . بقايا تلميع الرز ، بذور الحنطة ، بذور الذرة السكرية ، ماء نقيع الذرة ،

عامل النمو الثانوي	الصورة الفعالة	المجموعة الكيمياوية المنقولة	المادة اللازمة للأيفاء بالاحتياجات الايضية	المادة الأولية الخام مصدر عامل النمو
حامض النيكوتينيك	(1) نيكوتين أميدادنين	هيدروجين	(1) حامض النيكوتينيك أو نيكوتين أميد	ميسيليوم الفطر Penicillium المتخلف
أو نيكوتين أميد	(2) نبكوتين أميد ادينين ثنائي النيوكليوتيد فوسفات	هيدروجين	(2) نيوكليوتيدات النيكوتين أميد .	بذور الحنطة . الكبد .
	(3) نيكوتين أميد احادي النيوكليوتيد	هدروجين		
حامض البانتوثينيك	كوأنزيم أ	مجموعة أسيل	حامض بانتوثينك	(1) مولاس البنجر (2) ميسيليوم الفطر Penicillium المتخلف . (3)ماء نقيع الذرة .
سيانوكوبالامين (B_{12})		ازاحة الكربوكسيل	(1) سبانوكوبالامين	وحل البلاليع المنشط . الكبد .
		تخليق مجموعة مثيل .	(2) كوبالامينات اخرى	روث الابقار . ميسيليوم الـ Sterptomyces griseus السيلاج (علف اللحم .
حامض الفوليك	حامض تتراهيدرو فوليك	مجموعة فورميل	(1) حامض الفوليك	ميسيليوم الفطر Penicillum المتخلف
			(2) حامض بارا امينوبنزويك	السبيناخ الكبد .

عامل النمو الثانوي	الصورة الفعالة	المجموعة الكيمياوية المنقولة	المادة اللازمة للأحياء بالاحتياجات الأغذية	المادة الأولية الخام مصدر عامل النمو
البيوتين	البيوتين	تثبيت CO_2	البيوتين	مولاس القصب عالي الأختبار. ماء نقيع الذرة. ميسيليوم الفطر Penicillum المتخلف
حامض اللايبويك	حامض اللايبويك	الهيدروجين ومجاميع الأسيل	حامض الفا ـ لايبويك أو حامض ثايوستك Thioctic	الكبد
البيورنيات	نيوكليوتيدات البيورين		(1) بيورينات	اللحم.
			(2) نيوكليوتيدات مشتقة من البيورينات	الدم المجفف
البيريميدينات	نيوكليوتيدات البيريميدين		(1) بيريميدينات	اللحم
			(2) نيوكليوتيدات مشتقة من البيريميدينات	
الاينوسيتول	فوسفاتيدات		الاينوسيتول	ماء نقيع الذرة
الكولين	فوسفاتيدات		الكولين	صفار البيض حشيشة الدينار
الهيمنات Hemins	هيمنات الخلية	الالكترونات	الهيمنات	الدم.



الفصـــل الخامس

عزل وتنقية الاحياء المجهرية

Isolation and Screening of Microorganisms



يعد نوع الكائن المجهري المستخدم صناعيا مفتاحا لنجاح أو فشل العملية التخمرية فهو المحفز الذي يعمل لاعطاء الناتج المرغوب ، اذ ينبغي أن تكون له صفات أو مميزات عامة اذا اريد للعملية التي يحدثها أن تكون ممكنة الاجراء ، بصرف النظر عن طبيعة الناتج وبساطة أو تعقيد العملية الهندسية • ومن الصفات التي ينبغي توفرها في السلالة الميكروبية المختارة الاتي :ـ

1. ان تكون ثابتة وراثيا ، أي لا تنتج تلقائيا أنواعا مغايرة في الصفات •
2. أن تنتج بسهولة خلايا خضرية أو سبورات أو وحدات تكاثرية أخرى • ونظرا لان البازيديومايستيات تنتج فقط ميسليوم ، فانها نادرا ، ان لم يكن ابدا ، ما تستخدم في التخمرات الصناعية •
3. ان تنمو بنشاط وبسرعة بعد التلقيح في أحواض البذور او الاوعية الاخرى المستخدمة لتحضير الكميات الكبيرة من اللقاح قبل بدء التخمر الصناعي •
4. ان تكون مزرعة نقية ، ليس فقط خالية من الاحياء المجهرية الاخرى المرئية ميكروسكوبيا ، وانما أيضا خالية من الفاجات Phages •
5. ان تعطي الناتج المطلوب خلال فترة قصيرة من الزمن ، ويفضل ذلك في ثلاثة أيام او أكثر •
6. أن تعطي الناتج المرغوب دون تكوين مواد سامة ، كما ينبغي ان يكون هذا الناتج سهل الفصل عن كل المواد الاخرى •
7. ان تكون قادرة على حماية نفسها من التلوث قدر الامكان ، اذ قد تأخذ الحماية الذاتية شكل خفض الـ pH أو النمو على درجة حرارة عالية أو سريعة التطور لتثبط ميكروبي مرغوب فيه •
8. أن تكون سهلة الاحتفاظ بها لفترات طويلة ومعقولة من الزمن •
9. ان تكون سهلة الانقياد للتغير بواسطة عوامل تطفر معينة ، لذلك قد يتم مواكبة برنامج تطفري بهدف تطوير سلالات تعطي حاصلا متزايدا من الناتج •
10. أن تعطي كمية يمكن التنبؤ بها من الناتج المرغوب في وقت تخمري معين •

والاحياء المجهرية التي تلبي هذه الصفات ، أما أن تكون معزولة من الطبيعة

أو متحصلا عليها من مجموع مزرعي (بنك سلالات Culture Collection ∙ ويستلزم لعزل وتنقية وغربلة واختبار مزرعة ما من الطبيعة وجود شخص متخصص ومتدرب ∙ ونظرا لوجود نقص في مثل هؤلاء الناس المتدربين على العزل والتنقية في البلدان النامية ، فيبدو للعيان ان المجموعات المزرعية هي أفضل مصدر للاحياء المجهرية لاقامة صناعة تخمرية ∙ وبنفس الوقت فان الوقت الطويل والمال الوفير لن يضمن النجاح ∙ وللحصول على المزرعة المناسبة ، ينبغي عزل الكائن الحي المجهري في بعض الاحيان من بيئة مناسبة خاصة التي قد لا تتواجد في بلد معين ∙ وعلى سبيل المثال **Blakselea trispora** التي تنتج كميات كبيرة من بيتا ـ كاروتين لا يمكن عزلها من المناطق المعتدلة ، بل يجب على الواحد ان يبحث عن سلالات برية في المناطق الاستوائية تنمو على ازهار نباتات راقية معينة ∙ ولمثل هذه المزارع ، تعد المجموعات المزرعية دائما المصدر المنطقي الوحيد ∙

2. مصادر الاحياء المجهرية Source of Microorganisms

يمكن عزل الاحياء المجهرية عشوائيا من مصادر طبيعية مختلفة واختبار كل على حدة من ناحية قدرتها التخمرية ، الا ان فرص ايجاد واحدة منها ذات قيمة بواسطة هذه الوسائل تكون غير كبيرة ∙ ويمتلك عدد قليل فقط من المجموع الميكروبي الطبيعي المميزات والخصائص المرغوبة ∙ اذن لايجاد كائن حي مجهري يمكنه القيام بما تزيد من فعاليات ليس بالامر الهين ∙

ومن اكثر الطرق نجاحا في ايجاد مثل هذا الكائن الحي المجهري هو استخدام تقنية معينة تسمح بالحصول على عدد كبير من الاحياء المجهرية واختبارها دون الحاجة لاجراء دراسات واسعة عن كل كائن حي مجهري لوحده ∙ مثل هذه التقنية تكون متيسرة وتعرف بالغربلة Screening ∙ وتستخدم طريقة الغربلة بصور مختلفة تعتمد على : نوع الكائن الحي المجهري المرغوب ، والناتج المعين ذي الاهمية، واخيرا على المصدر الذي تم منه الحصول على الكائن الحي المجهري ∙

ولجعل طريقة الغربلة ذات استخدام مؤثر ومفيد ، يجب ان يكون لنا اولا مدخل الى المصدر الميكروبي الطبيعي الذي يحتوي على انواع عديدة مختلفة من الاحياء المجهرية ، سواء كانت غالبية هذه الاحياء معروفة ام غير معروفة لامتلاكها

للقدرات التخليقية التي نهتم بها · ان افضل مصدر يمكن منه الحصول على عدد متنوع وواسع من الاحياء المجهرية هي التربة · أما المصدر الاخر الذي لم يسبرغوره بعد الى حد كبير فهو البحر والطين البحري · والامثلة على المصادر الميكروبية الطبيعية الاخرى هي : الخضروات الطازجة والمتخمرة والمتعفنة ، والنباتات والحيوانات الحية ، ومياه المجاري ، والاغذية الطازجة والفاسدة والى ما شابه ذلك ·

السؤال الان هو لماذا تعتبر التربة المصدر المثالي الذي نحصل منه على أنواع مختلفة من الاحياء المجهرية ؟ ان الجواب واضح ، اذا اعتبرنا ان اكثر أنقاض العالم تجد طريقها الى التربة وهناك تتحلل بواسطة كائن حي مجهري أو بآخر · اذن يمكن ان نعتبر التربة كحوض تخمر طبيعي هائل اذ تشترك أحياؤها المجهرية في تهديم واعادة تخليق المواد العضوية البسيطة الى معقدة ، وفي اكسدة واختزال وتغيرات كيمياوية أخرى للمواد اللاعضوية · وعادة اكثر من نوع واحد وغالبا عدة أنواع من أحياء التربة المجهرية تكون قادرة على اجراء كل هذه التحولات الكيموحيوية او الكيمياوية الفردية ·

وكما عرفنا أنواعا مختلفة عديدة من الاحياء المجهرية موجودة في التربة ، فليس من الواضح الان وحتى وقتنا هذا كم هي نسبة الاحياء المعزولة في مزارع مختبرية نقية · وقد قدر مشتغلون عديدون أن طرق عد الطبق والعزل للعدد الكلي وانواع احياء التربة المجهرية حتى ولو كان ذلك باستخدام أفضل البيئات المعزولة وظروف التحضين ، من المحتمل ان يكون أقل من 1% فقط من أحياء التربة المجهرية قد تمت تنميتها في المختبر · وهذا يعني ان 99% أو أكثر من احياء التربة المجهرية لم تتم تنميتها بعد في المختبر · وعليه فان هذه الاحياء المجهرية تنتظر من يقوم بتهيئة بيئة وظروف مزرعية مناسبة تسمح لها بالنمو في المختبر ·

وكذلك تسمح التربة بدرجة معينة من التلاعب في المستويات النسبية لمكونات مجموعها الميكروبي قبل استخدام طرق الغربلة والعزل · فمستوى المواد الغذائية المتيسرة في التربة تكون عادة قليلة نسبيا ، في حين تكون المنافسة الميكروبية على هذه المواد الغذائية شديدة · فاذا أضيفت مادة معينة الى تربة رطبة ومن ثم تحضين التربة ، تحدث استجابة نمو اكبر نسبيا بين احياء التربة القادرة على

مهاجمة هذه المادة المغذية ، وبالتالي تسهل عملية عزل هذه الاحياء المجهرية المعنية ٠ وبكلمة أخرى انه يمكن اجراء عملية اغناء او تدعيم Enrichment للتربة من أجل الاحياء المجهرية ذات الاهتمام ٠ وايضا فقد تحضن التربة في بيئة مختبرية سائلة لتدعيمها من أجل أحياء مجهرية خاصة محاولة العزل ٠

3. الغربلة Screening

1.3. الغربلة الاولية Primary screening

تعرف الغربلة الاولية بانها استخدام طرق انتخابية عالية وذلك للكشف عن الاحياء المجهرية المهمة فقط وعزلها من بين مجموع ميكروبي كبير ٠

ومن أجل ان تكون عملية الغربلة مؤثرة ينبغي أن تؤدى بخطوة واحدة أو بعدة خطوات الى التخلص من العديد من الاحياء المجهرية العديمة القيمة ، وبنفس الوقت تسمح بالكشف السهل عن نسبة مئوية قليلة من الاحياء المجهرية المعقدة الموجودة في المجموع الميكروبي ٠ وتتضمن العملية نقل كمية من المصدر الطبيعي للاحياء المجهرية (كالتربة أو مياه المجاري أو أية مادة أخرى تحتوي على مجموع ميكروبي كبير ومختلف) بعد اجراء التخفيف المناسب الى بيئة انتخابية Selective medium يعقب ذلك تحضين المزرعة تحت ظروف معينة من الحرارة والتهوية وال pH بحيث تشجع نمو الاحياء المجهرية المرغوبة من بين بقية الاحياء الاخرى الموجودة ٠ يلي ذلك أخذ كمية بسيطة من هذه المزرعة الابتدائية ونقلها الى طبق آخر مجهز كالاول بنفس الطريقة ، ويستمر في العملية الى أن يسود الكائن الحي المجهري الذي يمكن ان يعزل في مزرعة نقية Pure culture.

واذا كانت سلالة من **Clostridium** يمكنها انتاج الاسيتون ـ البيوتانول من مسحوق الذرة مطلوبة لمثل هذه العملية ، فان خلطة معقمة من الذرة تلقح بتربة او بمياه المجاري أو باية مادة تحتوي على مجموع بكتيري كبير ٠ وتحفظ خلطة الذرة تحت ظروف لا هوائية عند درجة حرارة تخمر مرغوبة مثلا 37 م ٠ واذا بديء بعدد كبير من الدوارق ، فان الدوارق التي تعطي مظهر نمو لا هوائي نشط التي لها رائحة المذيب ستستخدم في تلقيح دوارن جديدة ٠ وهذه بدورها ستحضن الى حين ظهور مزرعة لها قدرة استثنائية على انتاج المذيب ٠ واخيرا يتم زرع السلالة المختارة **Clostridium** على بيئة مسحوق الذرة تحت ظروف

كل سلالة في التخمر الصناعي المقترح الذي يكون فيه مسحوق الذرة هو المـــادة الاولية الاساسية • وتجري تقديرات عن الناتج من المذيب ومن ثم تنتخب أفضـل سلالة للتقيم لغرض استخدامها في زيادة التخمر •

وهذه الطرائق المختلفة لا يمكن استخدامها دائما بسبب عـدم معرفتنا من اين نبحث عن السلالات المناسبة أو بسبب عدم معرفة الطبيعة الفعلية للنـــاتج المرغوب • ويعد البحث عن المضادات الحيوية Antibiotics مثالا على ذلك ، اذ دلت الابحاث المبدئيـة ان لسـلالة Streptomyces امكانيـات ممتـازة في انتاج المضادات الحيوية • من الدراسات الاولية على أحياء التربة ، فقد عـرف ان التربة وخصوصا تربـة الحـدائق أو الارض المزروعـة بالنبـاتات العشـبية Grass-land soil لها عدد كبير ومتنوع من أنواع الاحياء المجهرية والطريقة المستخدمة في هذا المجال هو الحصول على عينات مختلفة وعديدة من التربة ومن مناطق جغرافية وبيئية متباينة • وتزرع هذه الترب على بيئة مناسبة لنمو ال Streptomyces والبكتـريا ، وتعـزل الاعـداد الضـخمة من الاكتينوميستيات Actinomycetes. وغالبا ما يتأثر انتخاب المستعمرات من أجل عمل مزارع نقية بمشاهدة تأثيرها المثبط للمستعمرات البكتيرية والفطرية المجاورة او المتاخمة لها • ويختبر هذا الحشد من السلالات المنتخبة في أطباق تجاه المرض الهـدفي Target pathogen وبدرجة أكبر تجاه الاحياء المجهرية غير المؤذية والمعروفـة بانها تشبه المرض الى حد كبير • وقد تم تحسين طريقة الغربلة لانتاج المضادات الحيـوية باستخدام ما يسمى بكائن الاختبار Test organism وهو عبارة عن كائن حي مجهري يستخدم كدليل على وجود نشاط معين للمضادات الحيوية • لذلك فان تخفيفات من التربة او من مصادر ميكروبية أخرى تزرع على سطح بيئة صلبة (آجار) وتنمو المستعمرات المعزولة التي تكون بحدود 30-300 مستعمرة لكل طبق • وتحضن الاطباق الى أن يصبح قطر المستعمرات عدة مليمترات وبنفس الوقت يكون المضاد الحيوي قد تكون في تلك الاحياء القادرة على انتاجـه • بعـد ذلك يضاف معلق كائن الاختبار بطريقة ما على سطح الاجار وتحضن الاطباق لفترة أخرى للسماح لنمو كائن الاختبار • ويستدل على وجود نشاط تضـــاد حيـــوي

حــول لكائن الاختبار المثبطة النمو بواسطة المناطق Antibiotic Activity المستعمرات المنتجة للمضادات الحيوية • ويمكن اجراء تقــدير تقــريبي للكميات النسبية من المضاد الحيوي المتكون بواسطة المستعمرات المختلفة بقياس أقطار المناطق بالمليمترات المثبط فيها نمو كائن الاختبار • وبالتالي تؤخذ المستعمرات المنتجــة للمضادات الحيوية وتعزل وتنقى قبل اجراء اختبارات اضافية •

ويمكن اتباع نفس الاسلوب بالنسبة لمعرفة الاحياء المجهرية القــادرة على تخليق الفيتامينات والاحماض الامينية والاحماض العضوية واي مادة أيضية أخرى خارجيا • حيث تكون البيئة المستخدمة في التنمية ناقصــة بالمــادة الايضية تحت الدراسة • ومرة أخرى فان المصدر الميكروبي يخفف ويزرع ويحضن للحصول على المستعمرات ثم يستخدم كائن الاختبار (والذي يكون اختياره من الامور المهمة) للاستدلال على الميكروبات المنتجة لتلك المادة الايضية الناقصة من البيئة وذلك عن طريق قياس كثافة كائن الاختبار حول المستعمرات المنتجة لتلك المادة الايضية •

ونفس الشيء يمكــن اجــراؤه اذا أريد غربلة المصــدر الميكــروبي لايجـاد الاحياء المجهرية القادرة على استخدام مصدر كربوني أو نتروجيني معين للنمـــو والتخليق •

هذه هي أمثلة قليلة عن طريقة الغربلة الاولية ، لذلك فان أحسن طريقة هي أخذ عدة مركبات عضوية ومحاولة تقدير كيف يمكن غربلة الاحياء المجهرية القادرة على انتاج هذه المركبات •

2.2 الغربلة الثانوية Secondary screening

ان الغربلة الاولية تسمح بالكشف عن الاحياء المجهرية وعزلها وخاصة التي تمتلك قدرات تطبيقية صناعية مهمة • وعادة يعقب هذه الغربلة غربلة ثانــوية من أجل اختبار اضافي للقابليات ولكسب المعرفة عن هــذه الاحيــاء المجهــرية • وبالرغم مما يتم عزله من الاحياء المجهرية بالغربلة الاولية ، فان القليل منها يكون ذا قيمة تجارية حقيقية ويرجع السبب الى أن الغربلة الاولية تحدد أيا من الاحياء المجهرية يكون قادرا على انتاج المركب بدون اعطاء أية فكرة عن الانتاج أو القدرة الانتاجية للكائن الحي المجهري •

وفي المقابل فان الغربلة الثانوية تمتاز بالاتي :

1. تسمح بفرز اضافي لتلك الاحياء المجهرية التي لها قيمة حقيقية في العمليات الصناعية ونبذ تلك التي تنقصها هذه الامكانية ٠

2. تتم الغربلة الثانوية في اطباق آجار ، أو في دوارق أو مخمرات صغيرة تحتوي على البيئات السائلة ، أو بالجمع بين هذه الطرائق ٠ وعادة يفضل استخدام المزرعة السائلة لان الاخيرة تعطي صورة أفضل للاستجابات الغذائية والفيزياوية والانتاجية للكائن الحي المجهري الى الظروف الفعلية للتخمر الانتاجي ٠

3. قد تكون الغربلة الثانوية في أسلوب اجرائها وصفية او كمية ٠ فالطريقة الوصفية تدلنا على مدى الاحياء المجهرية الحساسة للمضادات الحيوية المكتشفة حديثا ٠ في حين تدلنا الطريقة الكمية على الناتج المتوقع من المضاد الحيوي عندما ينمى الكائن الحي المجهري في بيئات مختلفة متعددة ٠

4. تعطي الغربلة الثانوية معلومات متنوعة ضرورية من أجل تقييم القدرة الحقيقية للاحياء المجهرية للاستخدام الصناعي ٠ وعلى سبيل المثال فان الغربلة الثانوية تحدد ماهية أنواع الاحياء المجهرية المشتركة وفيما اذا أمكن تقسيمها في الاقل الى عائلات أو أجناس ٠ وهذه المعلومات ذات قيمة لاستخدامها في المقارنة بين الاحياء المجهرية المعزولة حديثا وبين تلك المذكورة في النشرات العلمية وبراءات الاختراع لقدرتها على انتاج منتجات التخمر المهمة تجاريا ٠ وأيضا يؤدي تقسيم الاحياء المجهرية الى التنبؤ عما اذا كانت ممرضة للنبات أو الحيوان او الانسان والتي ينبغي وضعها في الاعتبار أثناء التعامل مع هذه الاحياء المجهرية ٠

5. ينبغي أن تحدد الغربلة الثانوية ما اذا كانت الاحياء المجهرية منتجة فعليا لمركبات كيمياوية جديدة لم تذكر سابقا ، أو كبديل ينبغي ان تحدد الغربلة الثانوية مدى امكانية ايجاد عملية اكثر اقتصادية لعمليات تخمر أصبحت معروفة الان ٠

6. ينبغي ان تظهر الغربلة الثانوية عما اذا كان هناك pH او تهوية أو احتياجات محددة أخرى مترافقة مع الاحياء المجهرية المعنية سواء لنموها أو لتكوين النواتج الكيمياوية ٠ وكذلك يجب أن تكشف الغربلة الثانوية عن مدى الثبات

الوراثي العام للمزارع الميكروبية . لذلك فان الكائن الحي المجهري يكون قليل القيمة اذا كان يميل للتطفر او للتغير بطريقة معينة بحيث يفقد قدرته على تكديس محصول عال من الناتج . وكذلك ينبغي ان تظهر ما اذا كانت مكونات البيئة المعينة ناقصة أو قد تكون سامة لنمو الكائن الحي أو لقدرته على تكديس نواتج التخمر . ويجب ايضا ان تظهر شيئا من الثبات الكيمياوي للناتج ، وذائبية الناتج في المذيبات العضوية المختلفة . كما ينبغي ان تحدد الغربلة الثانوية ما اذا كان الناتج بسيطا أو معقدا أو حتى ذا تركيب جزيئي كبير . كما ينبغي ان تظهر مدى امتلاك الناتج للخواص الفيزياوية مثل الامتصاص في مدى الاشعة فوق البنفسجية والوميض Flourescence أو خواص كيمياوية يمكن استخدامها للكشف عن المركب أثناء استخدام التحليل الكروماتوجرافي الورقي أو طرق تحليلية أخرى التي تعد هامة في التنبؤ بتركيب المركب .

7. خلال الغربلة الثانوية المصاحبة لبعض أنواع نواتج التخمر ، ينبغي اجراء تقديرات عما اذا كان التسمم العام للحيوان او النبات أو الانسان يمكن ان يعزى الى ناتج التخمر وخصوصا اذا استخدم (مثل المضادات الحيوية) في معالجة الامراض .

8. وينبغي أن تظهر الغربلة الثانوية ما اذا كانت الاحياء المجهرية قادرة على التغيير الكيمياوي لنواتج تخمراتها أو حتى على هدمها . فالاحياء المجهرية وبسبب تكديس مستويات عالية من الناتج في المزرعة السائلة ، قد تنتج انزيمات تطبعية Adaptive enzymes تهدم فائدة وقيمة الناتج .

مما سبق نجد أنه يمكن للغربلة الثانوية توفير مدى واسع من المعلومات التي تساعد في تقدير أي من العزلات الميكروبية المختلفة تكون مؤهلة لان تصبح ذات منفعة صناعية . ومن الواضح أن الغربلة الثانوية تساعد في التنبؤ بالوسائل المستخدمة في مواكبة الابحاث الاضافية على الاحياء المجهرية وعملياتها التخمرية .

4. انتخاب السلالة وتحسينها Strain selection and its improvement

حالما نتوصل الى أن سلالة أو نوعا معينا من الاحياء المجهرية يكون قادرا على انتاج مركب نافع تجاريا بنطاق يجعل العملية الميكروبيولوجية للانتاج تتنافس مع التخليق الكيمياوي للمركب ، فان فحوصات عن سلالات اضافية من الكائن الحي

المجهري تعد الخطوة الطبيعية الاولى في عملية التطوير • ومن أجل الحصول أو الحفاظ على موقع اقتصادي تنافسي للتخمرات الجديدة أو الموجودة على التوالي ، غالبا يكون من الضروري ايجاد وسائل لزيادة الحاصل من ناتج التخمر بصرف النظر ما اذا كان ناتج التخمر مركبا كيمياويا أو خلايا ميكروبية •

صحيح أن التحكم بظروف التخمر سواء باستخدام أنسب كائن حي مجهري ، وبيئة ، وتهوية ، وتحريك ، ومضادات الرغاوي ، والتحكم بال pH وحرارة والخ ، يؤدي الى زيادة في ناتج التخمر ولكنها مع ذلك ليست بالزيادة الكبيرة المرجوة • ويقود هذا الوضع الى محاولة تغيير التركيب الوراثي Genetic make-up للخلايا الميكروبية بحيث يؤدي ذلك الى زيادة تكوين نواتج التخمر •

ويمكن تغيير التركيب الوراثي للخلية بواسطة التطفر Mutation ، والتجمع الوراثي الجنسي Sexual recombination ، والتحول المنقول Transduction والتحول Transformation ، وتحول الفاج Phage conversion وهكذا • من هذه العوامل السابقة يعد طريق التطفر حتى وقتنا هذا من أكثر الطرائق استخداما للاحياء المجهرية الصناعية • وفي الحقيقة أن برنامجا مستمرا من التطفر والانتخاب غالبا ما يكون ضروريا خلال عملية التطوير وحتى خلال الانتاج التجاري للتخمر وذلك للحفاظ على موقعه الاقتصادي ، خصوصا عندما يصاحب ذلك معرفة وافية لمسار التخليق الحيوي المشترك ، وعليه فان استخدام الطفرات يمكن ان يصبح مجزيا جدا •

وقبل البدء في برنامج التطفر والانتخاب يجب القيام بالاتي :ـ

1. الحصول على سلالة ميكروبية عالية الانتاج ومعرفة البيئة المثلى للانتاج •
2. التثبت من اننا نعمل مع أفضل تمثيل ممكن للمجموع الميكروبي العادي •
3. التثبت من أن جزء الانتخاب من برنامج التطفر هو فعلا انتخاب طفرات مشتقة جديدة وليس انتخاب اعضاء من المجموع الميكروبي العادي والذي يمتلك طبيعيا قدرة انتاجية عالية أو انها طبيعيا تسبب في تكوين طفرات • وهذا يعني ضرورة تفكيك المجموع الميكروبي العادي الى خلايا فردية (أو مستعمرات مشتقة من هذه الخلايا) واختبار القدرة التخمرية لكل منها من أجل انتخاب ضروب Variants عالية الانتاج طبيعيا •

وتستخدم برامج التطفر والانتخاب الاشعة المؤنية ، أو الاشعة فوق البنفسجية، أو عوامل الالكلة Alkylating agents ، أو حامض النتروز ، أو مشابهات البيورين والبيريميدين أو العوامل المطفرة Mutagenic Ag|nts الاخرى لتثبيت أو تغيير المادة الوراثية للخلية · وتستخدم هذه العوامل الطفرية بالمستويات المميتة للاحياء المجهرية بحيث يتم قتل حوالي 90-99% من المجموع الكلي · وهذا الموت يرجع جزئيا الى التأثير المميت للعوامل الطفرية وجزئيا الى حدوث طفرات مميتة للخلايا ، أي ان الطفرات تمنع تكوين مكونات هامة للاجهزة الايضية للخلية· وليس بالضرورة ان تكون جميع الخلايا الباقية على قيد الحياة طفرات وانما بنسبة مئوية ضئيلة جدا خاصة اذا أستلزم الامر اختيار طفرة من الطفرات لاعطاء تخمر حقيقي ذي قيمة كبيرة ·

لذلك من الضروري انتخاب تلك الخلايا القليلة فقط والتي تكون قد اكتسبت طفرة عالية الانتاج والمهمة بالنسبة لنا من بين الخلايا الباقية على قيد الحياة · وهذا الانتخاب هو أصعب جزء من برنامج التطفر بسبب المشاكل التي تصادفه في كشف الخلية التي اكتسبت طفرة مهمة من بين العديد من الخلايا الاخرى التي تعرضت للعامل الطفري · وتكون هذه المشكلة أقل حدة اذا كان برنامج التطفر قد صمم لانتخاب الاوكزوتروف Auxotroph (سلالة الكائن الحي المجهري الذي يحتاج الى مواد غذائية معينة لا تحتاجها السلالة الاصلية Prototroph التي نشأ منها) من بين السلالات التي تنطبق عليها الصفات القياسية للنوع أي Wild-type أو من بين مجموع الاباء العادي بدون اعتبار معين للقدرات الانتاجية للاوكزوتروف·

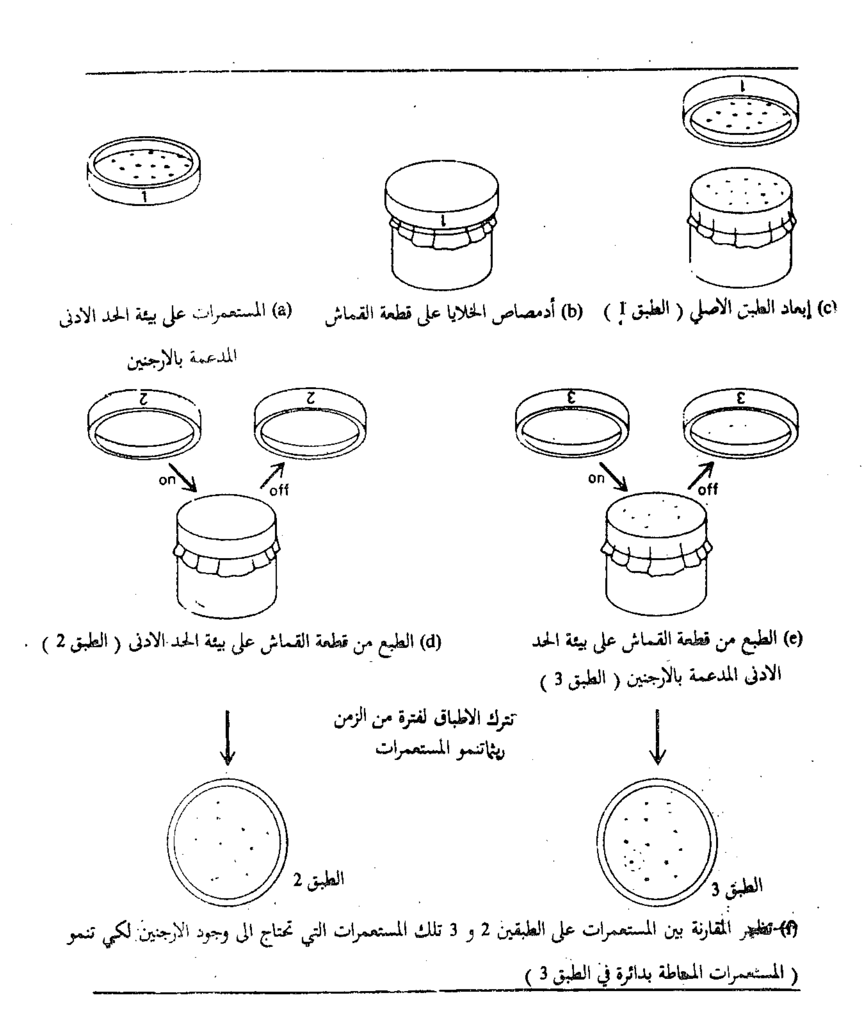
وقد أوجد Lederberg, Lederberg (1952) طريقة بسيطة تعرف باسم الانتخاب غير المباشر Indirect selection test أمكن بواسطتها اثبات حدوث الطفرات تلقائيا بعيدا عن الظروف الانتخابية للطفرات (كالمضاد الحيوي أو الفيروس البكتري) والتي تمنع تكاثر خلايا الاباء الحساسة وتسمح بنمو خلايا الطفرات المقاومة لها فقط · وبما أن معظم الطفرات تنشأ بمعدل قليل جدا يتراوح بين $1x10^{-4}$ - $1x10^{-10}$ ، فانه يلزم منع نمو الخلايا الاصلية الحساسة والكثيرة العدد اذا أريد مشاهدة هذه الخلايا الطفرية القليلة العدد ومن ثم عزلها ودراسة قابليتها التخمرية ·

ولعزل الطفرات التلقائية مباشرة تمكن Lederberg, Lederberg (1952)

من ايجاد طريقة بسيطة تسمح بنقل أو طبع المستعمرات النامية على الطبق الاصلي ، في نفس مواضعها ، على عدد من الاطباق المحتوية على بيئات انتخابية مختلفة . وتعرف هذه الطريقة بطريقة الطبع المتكرر بالاطباق Replica plating. وتتم عملية النقل أو الطبع بالاستعانة بقطعة من قماش القطيفة Velveteen المعقمة والمثبتة على قرص أو اسطوانة خشبية أو معدنية ذات قطر أقل قليلا من قطر أطباق بتري ، كما هو موضح في الشكل (1.5). وتستعمل عادة حلقة مطاطية أو معدنية لتثبيت قطعة القطيفة جيدا على الاسطوانة . وعندما يوضع القرص فوق سطح الطبق الاصلي تتلاصق كل المستعمرات وتنتقل كمية من كل مستعمرة الى قطعة القطيفة التي تصبح كانها نسخة (أو كليشة) يمكن طبعها بدون تحريك لوضعها على سطح الاجار في عديد من الاطباق الاخرى المحتوية على البيئة الانتخابية المرغوبة . والنمو الناتج عقب اجراء التلقيح بهذه الطريقة يسفر عن مستعمرات في نفس الامكنة التي كانت عليها في الطبق الاصلي .

ولما كانت الاطباق المحتوية على البيئات الانتخابية كل منها ناقصا في عامل غذائي معين فان أطباق الطبع ستظهر أي مستعمرة لم تنم وتختلف عن الطبق الرئيسي . وبالتالي فان ذلك يعني أن هذه المستعمرات تحتاج الى وجود العامل الغذائي في ذلك الطبق أو البيئة . وبعد ذلك تنقل المستعمرات الاصلية المماثلة وتختبر للتأكد من أنها حقيقة تمتلك الاعاقة أو التعطيل الايضي Metabolic block المرغوب ومن أنها قادرة على تكديس ناتج تخمري معين ذي انتاجية جيدة خلف هذا التعطيل .

وبصورة جوهرية اذا لم يتم استنباط نوع معين من غربلة التقدير الحيوي ، ينبغي اختبار جميع الخلايا أو على الاقل العديد من الخلايا التي بقيت على قيد الحياة بعد المعاملة بالعامل الطفري ، ويفضل ذلك أولا على بيئة آجار ثم في بيئة سائلة ، لقدرتها الانتاجية بالاضافة الى معدل تكوينها للناتج . وهنا تبرز مشكلة اخرى ، وهي ان البيئات الموزونة لتكوين ناتج التخمر من الخلايا الاصلية أو سلالة الـ Wild-type strain قد لا تكون ملائمة للطفرات الجديدة التي يتوخى منها أن تكون ذات قدرة انتاجية عالية . وكذلك قد لا تكون ظروف التخمر



(f) تظهر المقارنة بين المستعمرات على الطبقين 2 و 3 تلك المستعمرات التي تحتاج الى وجود الارجنين لكي تنمو (المستعمرات المحاطة بدائرة في الطبق 3)

الشكل (1.5). تكنيك الطبع المتكرر بالاطباق المستخدم في غربلة السلالات الطفرية التي تحتاج الى الارجنين .

متشابهة لذا ينبغي اختبار بيئة غنية أو عدة بيئات للكشف عن الطفرات العالية الانتاج وتقييمها ٠

والطفرة المتكونة حديثا قد لا تكون بالضرورة سلالة عالية الانتاج اذا زاد الثبات الوراثي خلال عملية التطفير لاباء الطفرات أو سلالة Wild-type لذلك فان انتخاب الاحياء المجهرية التي تقاوم العوامل الطفرية من أجل اولئك الذين يمتلكون ثباتا وراثيا متزايدا يكون صعبا ويحتاج الى اختبارات اضافية كثيرة ٠



الفصل السادس

مزارع الاحياء المجهرية النقية وطرق حفظها

Microbial Pure Cultures and Their Preservations



1. مقدمة Introduction

تمثل الأحياء المجهرية التي تتواجد في بيئاتها الطبيعية ، كتلك التي توجد في التربة والمياه أو تلك التي تعيش متطفلة أو مترممة على الانسجة النباتية والحيوانية الحية أو الميتة على التعاقب ، عددا كبيرا غير متجانس من الاجناس والانواع الميكروبية المختلفة . ولدراسة كل نوع من انواع الاحياء المجهرية بمفرده يشترط الحصول على مزرعة تحتوي على نوع واحد فقط من الاحياء المجهرية . وتعرف هذه المزارع باسم المزارع النقية Pure cultures . وهناك طرق عديدة يمكن بواسطتها الحصول على مزارع نقية من العينات المحتوية على مجاميع مختلفة Mixed population .

ويمكن تلخيص هذه الطرق بالآتي :

1. طريقة التخطيط على سطح الاطباق The streak plate method
2. طريقة الصب في الاطباق The pour plate technique
3. طريقة التخفيف المتسلسل The serial dilution technique
4. طريقة عزل الخلايا المفردة The single cell isolation technique

ويمكن للقارئ الرجوع الى تفاصيل هذه الطرق وكيفية اجرائها والتي تذكر في العديد من كتب البكتريولوجي والمايكروبيولوجي ، اذ لا يسع المجال لذكرها هنا .

وبعد دراسة طرق الحصول على المزارع الميكروبية النقية ، يتطلب الامر عادة معرفة كيفية الاحتفاظ بها حية في هذه الحالة من النقاوة والنشاط لفترات مختلفة من الزمن . لذلك ينبغي البحث عن الظروف والطرق المناسبة لتخزين الكائن الحي المجهري بشرط :

1. ان تجعل فعاليته الميكروبيولوجية أقل ما يمكن .
2. أن تضمن بقاءه حيا .
3. ان تحد من النمو الخضري والتكاثر لأن ذلك يؤدي الى حدوث طفرات أو تغيرات وراثية غير مرغوب فيها .

2. المزارع الخزنية Stock cultures

ان الاحياء المجهرية التي تعزل لاجراء تجارب جديدة أو تلك التي تعطي

أعلى ناتج تخمري للتخمرات القائمة بها تكون ذات قيمة كبيرة اذا أمكن تخزينها للاستخدامات المستقبلية بطريقة ما بحيث تبقى قدراتها على النمو والتكاثر بدون تغيير ٠

ويعد هذا صحيحا بالنسبة للسلالات القائمة بالانتاج وللسلالات المستخدمة في التقديرات البايولوجية ٠ وبالتالي فان الحفاظ على المزارع الخزين يلعب دورا هاما في أبحاث وانتاج التخمر الصناعي ٠

وفي معظم المختبرات المايكروبيولوجية يحتفظ بعدد كبير من المزارع النقية للاحياء المجهرية المختلفة والتي تعرف باسم مجموعة المزارع الاصلية أو الخزين Stock culture collection ، وتستخدم هذه المزارع في أغراض التدريس والبحث أو كمزارع قياسية لاختبارات معينة ٠

وهناك نوعان من المزارع الخزين :

1.2 خزين العمل Working stocks

وهي المزارع المستخدمة كثيرا التي ينبغي المحافظة عليها في ظروف نشطة وغير ملوثة ٠ ويحافظ على هذه المزارع في صورة آجار مائل Agar stants أو اجار عميق Agar stabs أو تحضيرات سبورية Spore preparations أو مزارع سائلة Broth cultures ، حيث يتم حفظها بالتبريد ٠ ويجب فحص هذه المزارع باستمرار لاي تغيير في صفات النمو ، والتغذية ، والقدرة التكاثرية ، والتلوث ٠

2.2 الخزين الاساس Primary stocks

وهي المزارع التي يحتفظ بها كخزين للتخمرات القائمة حاليا وللتخمرات الجديدة ، ولاغراض المقارنة ، وللتقديرات البايولوجية أو لبرامج غربلة لاحقة ٠ ولا يحتفظ بهذه المزارع في حالة عالية من النشاط الفسيولوجي ٠ ويجري النقل من هذه المزارع فقط عندما يراد تحضير مزرعة خزين عمل جديدة أو عندما يراد ثانية زراعة مزرعة الخزين الاساس لتجنب موت الخلايا ٠ وعليه تخزن مزارع الخزين الاساس بطريقة ما بحيث تحتاج الى أقل عدد ممكن من النقلات خلال مدة

من الزمن ، ولا يعد موت نسبة عالية من الخلايا في مزرعة التخزين الاساس مشكلة خطيرة اذا كان من الممكن استرجاع خلايا قابلة للحياة عن طريق زرعها ثانية في بيئة جديدة ، ويحتفظ بمزارع الخزين الاساس المخزونة على درجة حرارة الغرفة في تربة معقمة أو في بيئة صلبة أو بيئة سائلة بشرط تغطيتها بزيت معدني معقم ، ويمكن أيضا حفظ مزارع الاجار أو المرق بدون زيت معدني بالتبريد ، كما يحتفظ بالمزارع في الحليب أو الاجار بصورة مجمدة على درجة حرارة منخفضة ، وقد تجفد Lyophilization or freeze-drying هذه المزارع وتخزن على درجات حرارة منخفضة ،

3. طرق الاحتفاظ بالمزارع النقية Maintenance and preservation of pure cultures

3.1. النقل على فترات في بيئات جديدة Periodic transfer to fresh media

وتسمى هذه الطريقة أيضا بطريقة المزرعة الخزين المفتوحة Open stock culture اذ يمكن الاحتفاظ بمزارع الاحياء المجهرية النقية عن طريق نقلها على آجار مائل Stant أو اجار عميق Stab جديد ومعقم له نفس تركيب البيئة الاصلية وعلى فترات منتظمة ، ويتم هذا النقل على فترات تختلف مدتها تبعا لنوع الكائن الحي المجهري ، فكثير من مزارع الاحياء المجهرية غير ذاتية التغذية Heterotrophs يمكنها الاحتفاظ بحيويتها لفترة تتراوح بين عدة أسابيع الى عدة شهور اذا ما تركت نامية على بيئة الاجار المغذي Nutrient agar في حين ان هناك بعض الاحياء المجهرية (مثل بعض البكتريا) وبخاصة الممرضة خلال مدة تتراوح بين اسبوع الى اسبوعين ، وتبقى أنابيب هذه المزارع المحفوظة بهذه الطريقة مقفلة بواسطة سدادات قطنية أو اغطية معينة وتخزن المزارع على درجات حرارة منخفضة لمنع جفاف الاجار وللحد من النمو قدر الامكان ، لذلك يشترط للاحتفاظ بها حية وذات قدرة على احداث المرض للعائل ان تجدد مزارعها عند اتباع هذه الطريقة يجب مراعاة ما يلي :ـ

أ) نوع البيئة الغذائية المستعملة لكل نوع ميكروبي ،

ب) درجة حرارة التخزين ،

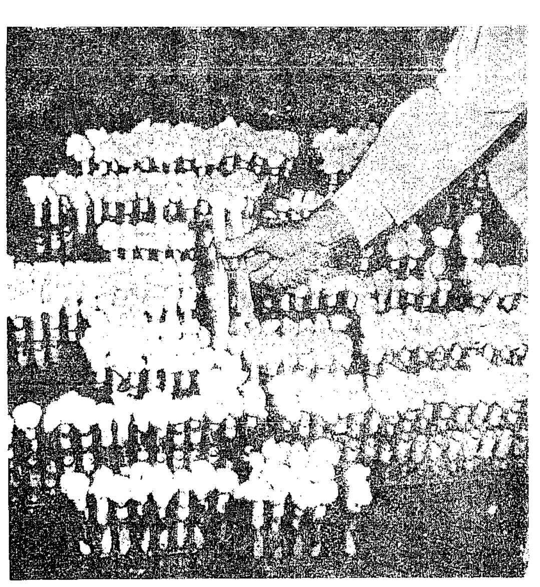
جـ) الفترات التي تجدد عليها المزارع ،

وتعد هذه الطريقة اقل طرق المزارع النقية دقة على الرغم من ان المزارع تبقى حية لمدة تصل الى ستة أشهر تحت التبريد وذلك لكثرة عمليات النقل الى بيئات جديدة . اذ ان كثرة عمليات النقل من هذه المزارع الى بيئات جديدة يصاحبه تكوين أجيال عديدة من الخلايا نتيجة للنمو والتكاثر مما يؤدي الى حدوث انتخاب لتغيرات وراثية غير مرغوب فيها في الكائن الحي المجهري . علاوة على هذه التغيرات فهناك امكانية تلوث المزرعة النقية بالاحياء الاخرى أثناء عمليات النقل المتكرر .

2- الحفظ تحت طبقة من الزيت المعدني

Preservation by overlying cultures with mineral oil

يمكن الاحتفاظ بالمزارع النقية لكثير من الاحياء المجهرية لفترات طويلة اذا غمر سطح النمو بكمية كافية من زيت معدني معقم (زيت البرافين) . ويشترط ان يغطي الزيت المعدني كل السطح المائل من الاجار ، وللتأكد من ذلك تضاف كمية من الزيت ليصل مستواها الى حوالي سنتمتر واحد فوق قمة الاجار المائل (الشكل 1.6) .



الشكل (1.6) حفظ المزارع الميكروبية تحت طبقة من زيت معدني

وتختلف حيوية الاحياء المجهرية المحفوظة بهذه الطريقة تبعا لنوع الكائن الحي ٠ الا أنه يمكن الاحتفاظ بالمزارع التي تعامل بهذه الطريقة لمدة تصل الى عدة سنوات ٠ وتتميز هذه الطريقة بامكانية أخذ جزء من النمو المغمور في الزيت بواسطة ابرة تلقيح Needle وتجديد نموها مع الاحتفاظ بالمزرعة الاصلية ٠

الا ان لهذه الطريقة بعض المساويء من أهمها هي مشكلة التخلص من الزيت المعدني قد يكون الاخير محملا بعدد كبير من هذه الاحياء المعرضة وبالتالي يصبح الزيت المعدني وسيلة لتوزيع وانتشار هذه المرضات في البيئة الخارجية ٠ لذلك يجب التفكير بوسيلة لاعدامه والتخلص منه بطريقة علمية دقيقة ٠

3.3 الحفظ في التربة المعقمة Preservation in sterile soil

لهذه الطريقة استخدام واسع من أجل الحفاظ على المزارع الخزين للاحياء المجهرية المكونة للسبورات ٠ وفي الحقيقة ان الاحياء المجهرية التي لا تكون سبورات يمكنها البقاء حية في التربة المعقمة ، ولكنها قد تموت بصورة غير متوقعة بعد فترة من الزمن ٠ وتحضر التربة بخلط كمية كافية من الرمل مع تربة غنية ماخوذة من حديقة Rich garden soil وذلك لجعل التربة سهلة التفتيت والمعاملة ٠ وتضاف كمية صغيرة من كربونات الكالسيوم الى التربة ثم توزع على أنابيب لها سدادات قطنية أو أغطية لولبية ٠ ثم تعقم الانابيب لحين التاكد من ان محتوياتها قد اصبحت معقمة ٠ يؤخذ حجم صغير من معلق كثيف للسبورات أو من مزرعة نامية نشطة غير مكونة للسبورات ويضاف الى التربة المعقمة ، وتطرد الرطوبة بالتجفيف تحت ضغط منخفض ٠ والمزارع المحفوظة بهذه الطريقة يمكن خزنها على درجة حرارة الغرفة لفترة طويلة من الزمن ٠

4.3 حفظ المزارع بالتجفيد Preservation of cultures by lyophilization

وتدعى هذه الطريقة أيضا بالتجفيف بعد التجميد Freeze-drying وهي من أكثر طرق حفظ المزارع النقية استخداما وأكثرها كفاءة اذ يمكن حفظ مزارع الاحياء المجهرية بهذه الصورة المجفدة لفترات طويلة قد تصل الى 20 سنة وأكثر ٠

وفي هذه الطريقة تجفف الخلايا بسرعة فائقة وهي مجمدة وذلك بوضـع الخـلايا المعلقة بمادة حاملة أو واقية مناسبة مثل السيرم البقري Bovin serum المعقم أو سيرم الدم أو الحليب أو محاليل سكرية معينة في أنابيب صغيرة Ampules مسحوبة القمة ثم تجمد بسرعة (كأن تغمر في مزيج من الثلج الجاف Dryice والكحول حتى تصل درجة حرارتها الى ــ 87م) ومن ثم توصل فوهـة الانابيب الصغيرة الى جهاز التفريغ تحت ضغط منخفض جدا • وبعد التأكـد من حـدوث التفريغ وجفاف الماء بالتسامي تغلق الانبوبة بأحكام وذلك بتعريض عنقها الى لهب الاوكسجين والانبوبة لا زالت تحت ظروف التفريغ • وعندما الاستخدام فان المزرعة المجفدة تعلق في كمية صغيرة من بيئة النمو ومن ثم تحضن على درجة الحرارة المناسبة •

وكما ذكرنا فان هذه الطريقة تعتبر الطريقة المثلى لحفظ مزارع الاحيـاء المجهرية النقية وذلك :ـ

أ) انها تحافظ على كميات كبيرة من الخلايا الميكروبية لفتـرة تخـزين طويلة جدا •

ب) انها تشغل حيزا صغيرا بالنسبة لمكوناتها •

جـ) يمكن خزن المزارع المجفدة تحت ظروف خزن اعتيادية •

د) لا تتعرض للتلوث أثناء التخزين •

هـ) لا تحدث أية تغيرات وراثية نتيجة الحفظ بهذه الطريقة •

وعند اتباع هذه الطريقة يجب مراعاة بعض الامور المهمة لكي لا تتأثر حيوية الكائن المجهري وهو بحالته المجفدة ، وهذه تتلخص في الاتي :ـ

أ) طبيعة البيئة التي يعلق فيها الكائن الحي المجهري •

ب) عمر الكائن الحي المجهري •

جـ) تركيز الخلايا في المعلق •

د) درجات التفريغ المستخدمة •

وبغض النظـر عن الطريقة او الطـرائق المختـارة لحفظ مزارع الخـزين الاساس ، فمن الاهمية الكبرى ان تحفظ سجلات جيدة ووصفية عن هذه المـزارع

وان توضع بعض الملصقات عليها . فاذا عرف وسجل القليل عن السلالات الميكروبية المعزولة حديثا ، فلا يمكن ان نامل في تمييز التغيرات التي قد تحدث في تلك المزرعة بعد فترة طويلة من التخزين .

4. مشاكل الاحتفاظ بمزارع صناعية ثابتة

نتيجة لتقدم علم المايكروبيولوجي والخبرة في معاملة المزارع الميكروبية من جميع الانواع خلال هذه السنوات الطويلة ، ينبغي اتباع خطوات معينة حالما يتم عزل الكائن الحي المجهري في مزرعة نقية وذلك لضمان بقائه في حالة ثابتة . هذه الخطوات يجب ان تتبع حال وصول المزرعة الى المختبر أو حال عزلها وقبل معرفة قدرتها التخصصية أو أن تكون المعرفة فيها ناقصة ومن هذه الخطوات الواجب اتباعها الاتي :-

1. فحص المزرعة تحت المجهر المحلل Dissecting microsrppe لتحديد : (أ) ان المزرعة تنمو بانتظام ، (ب) انها خالية من الاحياء المجهرية الاخرى ، (جـ) اذا كانت عفنا فان السبورات الناضجة تكون موجودة ، (د) ان تظهر المزرعة كونها جنسا أو لربما نوعا معزولا أو مسمى عند استلامه . هذا الفحص سيحدد الخطوة التالية الواجب اتباعها .

2. اذا ظهرت المزرعة بانها نقية ، واظهرت نموا نشطا ومنتظما ، ولها سبورات ناضجة ، فيجب في الحال تجفيد 3-5 زجاجات (امبولات) من الكائن الحي المجهري .

3. اذا عرفت السلالة بأنها عضو لنوع أو جنس والتي تنجح معه دائما عملية التجفيد ، فلا داعي للتأكد من قدرتها على الحياة . ومع ذلك من الامور المتبعة حتى مع مثل هذه السلالة هو التضحية بانبوبة تجفيد واحدة وتخفيف أو تخطيط المزرعة على وسط نمو مناسب . وسيظهر فحص القدرة على النمو Viability check ثلاثة امور :-

(أ) اذا كانت الخلايا باقية على قيد الحياة باعداد كبيرة ، (ب) اذا كانت التحضيرات المجفدة خالية من الاحياء المجهرية الاخرى ، (جـ) اذا كانت المزرعة المجددة لا تزال

منتظمة في النمو وتكوين السبورات • واذا كانت السلالة المحفوظة لم تجفد من قبل ، فان فحص القدرة على الحياة يكون ضروريا بسبب أن بعض الاحياء المجهرية تفشل في تحمل هذه العملية • وفي حالة الفشل ، يجب ايجاد طريقة بديلة في حين تبقى مزرعة الجيل الاول متيسرة وفي حالة جيدة •

4. اذا استرجعت المزرعة بنجاح من حالتها المجفدة أو من تحضيرات محفوظة بطريقة أخرى كالتجميد في النتروجين السائل ، ينبغي حفظ سجلات عن البيئة المناسبة للنمو وتكوين السبورات كما هو الحال بالنسبة للاحتياجات الخاصة كدرجة حرارة التحضين أو مدة التحضين أو الـ pH • وعلى سبيل المثال الفطر Blakeslea trispora (المستخدم في انتاج بيتا ـ كاروتين) يكون سبورات بسرعة (3—4 أيام على 25 م) ولكن خلال 10 أيام غالبا ما تنبت السبورات في مكانها • وبالتالي يكون التجفيد عقب ذلك فاشلا تماما • الا ان العملية تصبح أفضل اذا تم الحفظ بالتجفيد عندما تكون السبورات قد وصلت توا الى مرحلة النضج •

5. يجب خزن انابيب التجفيد على درجة حرارة 4—10 م ، وربما تفحص قدرتها على الحياة في نهاية كل 10 سنوات من التخزين •

6. عند اجراء التجفيد ، ينبغي فحص المزرعة بطريقة مناسبة لتحديد هويتها وقد يؤدي هذا الفحص في بعض الاحيان الى التعرف على النوع Species والضرب Variety ، في حين في أحيان أخرى يؤدي فقط الى النوع والجنس التقريبي • وعليه فان السجلات قد تعمل بالتأكيد على أظهار الهوية التقريبية وذلك لانها :ـ

أ) تجعل القائم بتنشيط المزرعة من جديد ، ولربما بعد سنوات ، من معرفة ما تم حفظه •

ب) تجعل السجلات كاملة بدرجة كبيرة وبالتالي اكثر فائدة •

وفي بعض مجموعات الفطريات قد تؤخذ صور مجهرية Microphotograph للفطر عند زمن التعرف • وهذه تعد طريقة ممتازة للتسجيل •

7. وفي نفس وقت عمل التحضيرات المجفدة ، ينبغي أن تكون السجلات كاملة وموضحة للنقاط التالية :ـ

(أ) اسم الكائن الحي المجهري (ب) مصدره اذا كان قد عزل من المختبر أو استلم من شخص ميكروبيولوجي آخر ، وفي الحالة الاخيرة يجب ذكر اسمه وعنوانه • (جـ) رقم التكاثر المخصص أو أي علامة مميزة معطاة له ، كرقم مؤقت أو أي رقم مختبري أو مجموعة اخر ، (د) موقع وأصل مصدر المادة (حيثما وجد الكائن الحي المجهري في الطبيعة) ، (هـ) احتياجات خاصة ـ بيئة المحافظة ، ودرجة الحرارة المثلى ، وظروف أخرى ، (و) النواتج ذوات الخواص الفريدة والكميات التقريبية الناتجة ، (ز) عدد المزارع المعمولة ، و (ح) المراجع اذا كانت السلالة مذكورة في بحث أو براءة اكتشاف •

ومن النادر جمع كل هذه المعلومات ، ومع الزمن فان معلومات أضافية تلزم لهذه السجلات ويمكن وضع المعلومات على كارتات تفهرس بشكل بسيط بحيث يسهل لاي كان ان يجد المزرعة بواسطة الرقم ، والمصدر ، والناتج ، والاسم •

8. اذا كانت المزرعة لا تفي بالمتطلبات المذكورة في النقطة رقم (2) اعلاه ، فتتبع الخطوات التالية :ـ اذا كانت المزرعة نقية ولكنها تظهر تجزئات Sectoring يتم تجفيد المزرعة غير المنتظمة ، وكذلك تعزل الاشكال المختلفة بصورة منفصلة ثم يجفد كل نوع على حدة • وفي بعض الاحيان لا يمكن فصل المزرعة المختلطة Heterogenous culture الى مكوناتها • ان الغاية من تجفيد المزرعة المجزأة Sectoring culture هو محاولة حفظ كل الاجزاء المكونة لها وذلك لانه عند هذه المرحلة نحن لا نعرف أي جزء منها نحتاجه فعليا فيما بعد • واذا كانت المزرعة غير نقية فيجب استخدام طرائق للتخلص من الملوثات اما بواسطة التخفيف المتسلسل ثم أخذ المستعمرة المعزولة ، أو بواسطة أخذ عدد من السبورات من الرأس الثمري Fruiting head •

9. تستخدم دائما طريقتان مختلفتان للحفظ في نفس الوقت • وعلى سبيل المثال ، يحتفظ ببعض المزارع الفطرية على الاجار المائل مع النقل على فترات علاوة على الحفظ بالحالة المجفدة • وكذلك تعد طريقتا الحفظ تحت زيت معدني وفي تربة معقمة من الاحتمالات الممكنة الاخرى في هذا المجال •

10. اذا استلمت مزرعة مجفدة ، ينبغي اتباع خطوات معينة للحصول على افضل

مزرعة • ومن المحتمل ان تكون القدرة على تكوين السبورات في تدهور ، لذلك فان سلسلة من اطباق التجفيف غالبا ما تنتج بعض المستعمرات التي تنمو بنشاط أو تعطي سبورات كثيرة بطريقة طبيعية • وفي بعض المزارع وخصوصا الاعفان ، قد يؤدي عزل السبورات من الرؤوس الفردية الى مزارع أفضل • وفي حالات أخرى قد يعود الفشل الى البيئة أو ظروف النمو • وعلى اية حال حتى مع المزارع التي تنمو وتكون اجساما ثمرية على بيئة تركيبية 'Synthetic medium . فانها تفعل ذلك بصورة أفضل لو كانت البيئة محتوية على النتروجين وعوامل النمو في صورة مستخلص المولت أو الخميرة •

ومن المناسب ذكر عدد من المبادىء والاساسيات المهمة في تنمية الاحياء المجهرية وذلك لضمان بادئات نشطة وصحية وثابتة ، منها الاتي :ـ

1. للحفاظ على المزارع الخزائن فان بيئة غير معرفة كيمياويا ولكنها تعطي نتائج قابلة للتكرار تعد أفضل من البيئة التركيبية • فالكائن الحي المجهري ، وكما هو موجود في الطبيعة ، ينمو دائما على مادة غير معرفة أو محددة • ومن المرجح ان تنتخب البيئة المعرفة او المحددة Defined medium جزءا معينا من المجموع الوراثي • وقد تكون النتيجة خفض كمية الناتج المرغوب •

2. بصورة عامة ، ينبغي ان لا تكون بيئة المزرعة الخزين غنية بالمواد الغذائية اكثر من اللازم لتخليد المزرعة بدون تغيير •

3. دائما تكون المزارع الخزين معرضة لمجموعتين مختلفتين من الظروف • الاولى هي انها تكون مشجعة للنمو بسرعة وبنشاط ولفترة قصيرة نسبيا بواسطة تحضينها عند درجات حرارتها المثلى أو قربها ، واذا كانت هوائية يسمح لها بحرية الوصول الى الهواء • وبالتالي يتم حثها لتبطيء من أيضها بحفظها لفترة طويلة نسبيا في الثلاجة وفي بعض الاحيان بتحديد وصولها الى الهواء بقفل انابيب الاختبار والدوارق واطباق بتري • اذ يعوق الغلق أو القفل ايضا من فقد الرطوبة من المزرعة • ولا تكون هذه التغايرات مختلفة كثيرا عن تلك التي تواجهها في الطبيعة • وبصرف النظر فانها تبدو غير مؤذية للاحياء المجهرية •

ويعد pH الوسط مهما ، وعموما فان البكتريا تنمو في بيئة متعادلة ، وتنمو الاعفان في بيئة لها pH بين 6 , 7 والخمائر قرب pH 6. •

4. عندما يتم البدء بمزارع جديدة ، يؤخذ لقاح من مزرعة ناضجة • وهـذه تشتمل على كمية بسيطة من نمو الخمائر أو البكتريا أو الاعفان وعلى عدد قليل من السبورات بدون المايسليوم •

5. مجموعات المزارع النموذجية Type-culture collections

كما ذكرنا سابقا ان الجهد المبذول لاعطاء التخمر يكمن بالدرجة الاساس في الكائـن الحي المجهري المعين المستخدم ، بالاضـافة الى الظـروف البيئية والتركيب الوراثي • ومن المهم جدا المحافظة على تجانس وعدم تغير الاحياء المجهرية وذلك تحت ظروف معينة تبقي على حيويتها وتقلل من فقدان صفاتها التخمرية • ان هذا العمل هو من وظيفة مختبر المجموعة المزرعية Culture Collection Laboratory

وينبغي أن يتضـمن هذا المختبر ، غرفة مجهزة بهواء معقم يحافظ عليه تحت ضغط بسيط خلال الزرع والتلقيح • ويمكن أجراء النقل المعقم في المختبر اذا اتخذت احتياطات معينة للحفاظ على سكون الهواء وذلك بغلق النوافذ والابواب • وكذلك تجري عمليات نظافة وتطهير دورية للجدران والسقوف والمناضد والاثاث وذلك لتقليل تلوث المزارع النقية • رغم وجود هذه المختبرات في أغلب الجامعات ومعاهد البحوث والمصانع الا انها لا يمكن اعتبارها مصدرا رئيسا لتوزيع المزارع النقية الى كل من يطلبها وبالاعداد المطلوبة • وعادة تقوم هذه المختبرات بارسال نماذج من مزارع الاحياء المجهرية الموجودة لديها الى من يطلبها من باحثين فـي الجامعات والمؤسسات الانتاجية بدون مقابل لاغراض البحث العلمي وبالتالي فانها لا تقوم بنشر قائمة دورية بما لديها من مزارع ميكروبية • وبنفس الوقت فان برامج التطوير المكثف عن احيـاء مجهرية جـديدة وعزلها تكـون محـدودة لقلة الامكانيات المتاحة لها •

الا ان هناك هيئات وجهات رسمية وحكومية لها نشاط اكبر في هذا المجال ومتخصصة في الكشف والعزل وانتاج مزارع نقية للاحياء المجهرية ولها برنامج متخصص للبحث والاستقصاء عن اعداد كبيرة من الاحياء المجهرية ومدى استخدامها في الاغراض المختلفة • وتقوم هذه الهيئات باصدار قائمة دورية عما تمتلكه من مزارع الاحياء المجهرية ، وترسل هذه المزارع الى كافة انحاء العالم لمن يطلبهـــا

وبثمن معين ٠ كما تقوم هذه الهيئات بخدمات أخرى كالتعرف على الاحياء المجهرية التي يعزلها الباحثون في ارجاء المعمورة وكذلك حفظ المزارع الميكروبية بالتجفيد أو بطرق الحفظ الاخرى ٠ وفيما يلي عدد من مجموعات المزارع النموذجية الوطنية في العالم :ـ

1. Commonwealth Mycological Institute, Collection of Fungus Cultures, Ferry Lane, Kew, Surrey, England.

2. Culture Collection of Algae and Protozoa, Botany School, Cambridge, England.

3. National Collection of Type-Cultures, Central Public Health Laboratory, Colindale Avenue, London, N.Y. 9., England.

4. National Collection of Yeast Cultures, Brewing Industry Research Foundation, Lyttel Hall, Nutfield, Nr. Redhill, Surrey, England.

5. Institute Pasteur, Paris, France.

6. Institute for fermentation, Microbiological Type-Culture Collection, 4-54, Juso-Nishinocho, Higashiyodogawa-Ku, Osaka, Japan.

7. Centralbreau Voor Schimmelcultures, Javalaan 20, Baarn, Netherlands.

8. The National Collection of Industrial Bacteria, Department of Scientific and Industrial Research, Torry Research Station, P. O. Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen, Scotland.

9. Centre de Collections de Types Microbiens, 19 Rue Cesar-Roux, Lausanne, Switzerland.

10. American Type-Culture Collections, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U. S. A.

11. Culture Collection Unit, Fermentation Division, Northern Utilization Research Branch, U.S. Department of Agriculture, Peoria 5, Illinois, U. S. A.

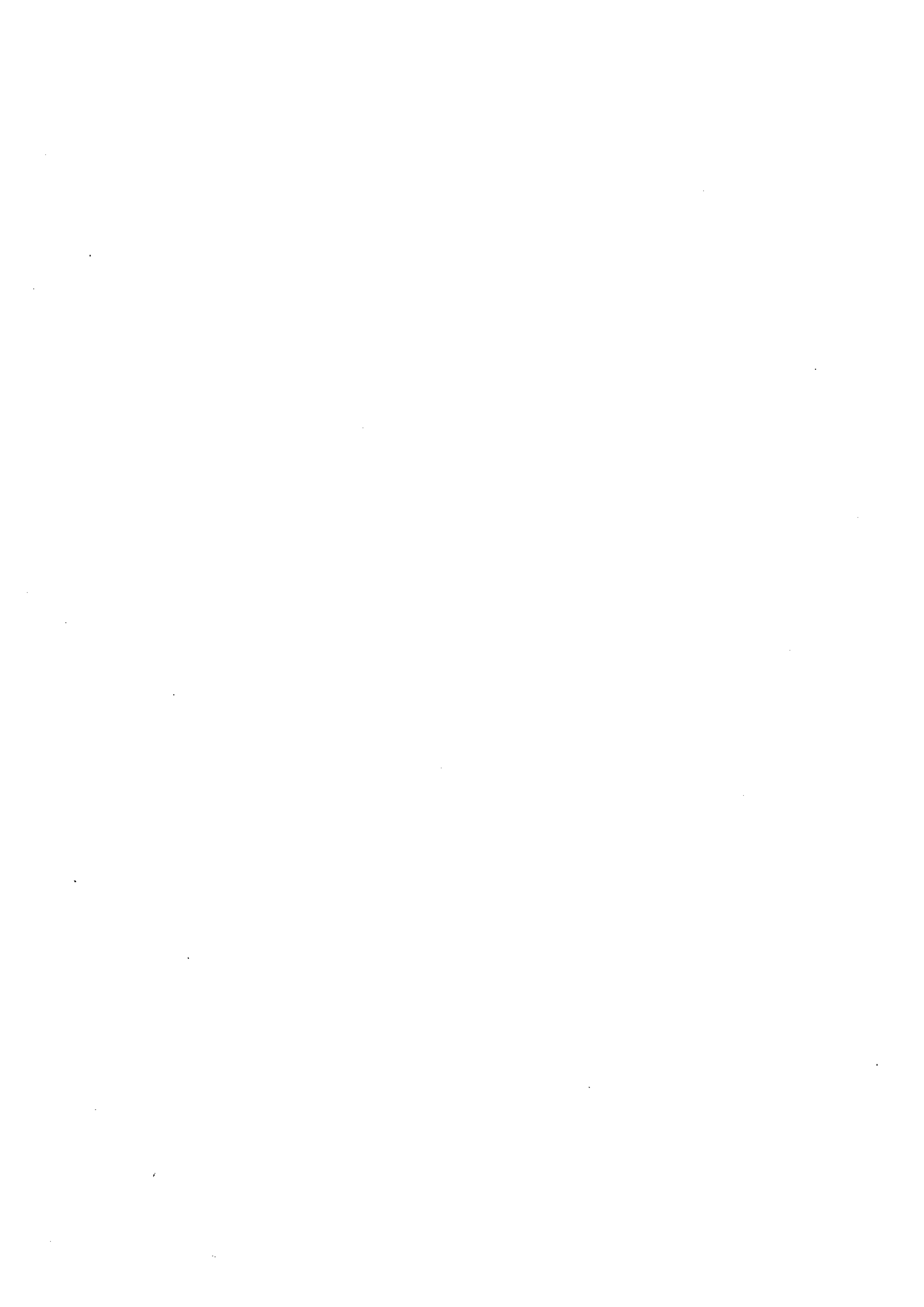
12. U. S. S. R. Antibiotics Research Institute, Moscow, U. S. S. R.

الفصل السابع

اللقاح أو البادىء

Inoculum or Starter

1 . مقدمة
3 . الاعتبارات المهمة في تحضير اللقاح أو البادىء
2 . الاقلمة أو التطبيع



1 . مقدمة Introduction

يعد انتاج اللقاح أو البادىء من المراحل المهمة جداً في عملية التخمر الصناعي ومن الواضح انه اذا لقحت بيئة تخمر في حوض سعة 2000 هكتولترا بقطرة واحدة loopful من اللقاح ، فان ذلك يحتاج لوقت طويل جدا قبل مشاهدة حدوث نمو ملحوظ ويحتاج الى وقت أطول قبل التمكن من الكشف عن الناتج ٠

وعليه ينبغي تحضير لقاح أو بادىء بتتابع مرحلي وذلك باستخدام أحجام متزايدة من البيئة ٠ وتحتاج جميع خطوات تحضير اللقاح ، عدا الخطوة الابتدائية التي يتم فيها تلقيح البيئة مباشرة من المزرعة الخزين ، الى نقل كمية من اللقاح مقدارها 0.5—5 % بالحجم من الخطوة السابقة الى التالية في التتابع ٠ وعند كل خطوة ينبغي أن ينمو الكائن الحي المجهري بسرعة وباعداد كبيرة بحيث تكون المدة اللازمة للتحضين قصيرة نسبيا ٠ كما ينبغي أن تتراكم نواتج التخمر بقلة ، اذا حدث ان تراكمت خلال مراحل تحضير اللقاح ، وذلك بسبب ضرورة نقل الخلايا الى كميات اكبر من البيئة وهي لا تزال في أطوار نموها اللوغاريتمية وقبل حدوث تراكم طبيعي لنواتج التخمر ٠

وفي الحقيقة ، عادة ما تكون بيئة اللقاح موزونة من أجل اعطاء نمو خلوي سريع وليس من أجل تكوين الناتج ٠

2 . الاعتبارات المهمة في تحضير اللقاح أو البادىء

General Consideration in Inoculum or Starter Preparation

عادة تكون نسبة اللقاح المضافة الى حوض الانتاج بحدود 0.5—5 % وقد تصل في بعض الاحيان الى 20 % أو اكثر ٠ ان النسب العالية من اللقاح تستخدم تحت ظروف تتواجد فيها مثبطات النمو أو استرجاع طاقي ضعيف الى الخلايا ، كما هو الحال في تخمر البيبكبريتيت ـ الخميرة ـ الجليسيرول ، حيث لا تسمح بحدوث نمو مفرط للكائن الحي المجهري في بيئة التخمر الانتاجي ٠ وتوجد حالة مشابهة عندما يستخدم لقاح سبق تنميته من أجل تحولات انزيمية معينة ، مثل استخدام خلايا **Aerobacter aerogenes**

لتجهيز انزيم $\propto, \in$ –diaminopimelic acid decarboxylase لازالة كربوكسيل حامض $\propto, \in$ –diaminopimelic acid وتحويله الى L – لايسين ٠

ان اضافة المستويات العالية والمتنوعة من اللقاح الى التخمر قد تقتضي ان يتم ترسيب خلايا اللقاح أو فصلها بالطرد المركزي أو بأية وسيلة أخرى لفصل الخلايا عن بيئة نمو اللقاح بحيث لا تسبب الاضافة الكبيرة للخلايا في حدوث تخفيف شديد لبيئة الانتاج أو تغيرات غير مرغوبة في الـ pH ، أو الاحتفاظ بمواد مغذية غير مرغوبة أو نواتج أيضية متخلفة ٠

وتعد نوعية اللقاح وتكاثره من العوامل المهمة في زيادة الانتاج وفي الحصول على نتائج تجريبية جيدة في الاحواض الصغيرة المستخدمة في الدراسات البحثية ٠ ومن أجل هذه الدراسات ، ينبغي وجود لقاح كاف ومتيسر من وجبة واحدة بحيث يمكن توزيعه بانتظام وذلك لجعل كل حوض يأخذ لقاحا مماثلا ٠ وعليه فان النتائج التجريبية من متغيرات سبقت دراستها في أحواض تخمير تكون نوعا ما عديمة القيمة اذا لقحت الاحواض بكميات متباينة من اللقاح أو بلقاح من نوعية مختلفة ٠

ومن الثابت انه ينبغي وجود أجيال عديدة من خلايا الاحياء المجهرية خلال عملية انتاج ابتداءا من المزرعة الخزين حتى عملية التلقيح النهائية ، على شرط ان لا يتغير الكائن الحي المجهري فسيولوجيا أو وراثيا خلال هذا التكاثر الخلوي ٠

ومع ذلك فقد تحدث طفرات بين هذه الخلايا ، على الرغم من أن حدوث طفرة معينة عادة لا يكون كثيرا ، وعندما تحدث فانها عادة ما تكون قاتلة للخلية او انها لا توفر ميزة اختيارية للخلية في نموها التنافسي مع الخلايا غير المتطفرة ٠ وبالتالي فان حدوث طفرة عند تكوين اللقاح لا يكون خطيرا بدرجة كبيرة الا اذا أدت الى اعطاء الكائن الحي المجهري ميزة نمو محدودة وكذلك قدرة متغيرة لتكوين ناتج التخمر ٠ وقد تنشأ مشكلة خطيرة اذا كان الكائن الحي المجهري المستخدم في التخمر هو نفسه سلالة طفرية ٠ والطفرات لا تكون ثابتة دائما ، وكثرة حدوث تطفر رجعي back mutation أو تطفر معين قد يكون عاليا ، وبالتالي فان اللقاح لاحواض الانتاج قد تحتوي على جزء مهم من الطفرات الرجعية ٠ ومن الواضح أن ظروف التخمر وكذلك البيئات تميل الى انتخاب سلالة تخمر طفرية

من اجل النمو أو ضد نمو الطفرات الرجعية التي تكون محدودة الفائدة في انتاج لقاح من هذا النوع من الكائنات الحية • وينبغي التحكم بدقة وعناية متناهيتين بطريقة الاحتفاظ بالمزارع الخزين لسلالات تخمرية طفرية ، بحيث أن أقل عدد ممكن من الطفرات الرجعية تجد طريقها الى انتاج اللقاح •

ويشابه التاقلم أو التطبع الانزيمي في الاحياء المجهرية التغير الطفري ، الا أنه ليس صفة موروثة • فالكائن الحي المجهري لا ينتج باستمرار مستويات عالية من الانزيمات لمهاجمة كل مواد التفاعل الموجودة التي لها القدرة المتأصلة لمهاجمتها • وانما ينتج فقط كميات من تلك الانزيمات التي هو بحاجة حقيقية لها • وبعض هذه الانزيمات قد تكون انزيمات تطبعية adaptive enzymes تنتج فقط استجابة لوجود مادة تفاعل substrate يحتاج الكائن الحي استخدامها من أجل الطاقة والنمو • واذا حذفت مثل هذه المادة من البيئة او استنفذت ، فان الكائن الحي المجهري في أجياله التالية يقلل انتاجه من الانزيم التطبعي الخاص • وغالبا ما تستخدم التخمرات الصناعية نشاطات الانزيمات التطبعية للاحياء المجهرية ، وبالتالي فان هذه الانزيمات ينبغي ان تكون موجودة باكبر كمية ممكنة خلال الانتاج • لذلك يجب اخذ الحيطة من وجود مادة تفاعل محثة اما في جميع خطوات بناء اللقاح او على الاقل في المراحل النهائية • واذا لم يستوف هذا الاعتبار ، فقد يلاحظ تباطؤ واضح في النمو وذلك في حوض الانتاج مباشرة بعد التلقيح في حين تكون الاحياء المجهرية التطبعية الانزيمات اللازمة لاستعمال مادة التفاعل المحثة •

ان نقل النمو الميكروبي من المزارع الخزائن الى البيئات السائلة ، وبدء النمو فيها قد يسبب ظهور بعض المشاكل في ما يتعلق ببدء بناء اللقاح • اذ تعلق الخلايا الخضرية للبكتريا وسبوراتها في وسط مخفف ومعقم وذلك لاضافته الى البيئة السائلة ، وبالاضافة الى ما ذكر فان السبورات البكتيرية وخصوصا تلك التابعة لجنس **Clostridium** غالبا ما تحتاج الى معاملة أو صدمة حرارية heat shocking لتشجيع نسبة عالية من السبورات على النمو • وعلى سبيل المثال توضع السبورات ذات المقاومة العالية للحرارة مثل **Clostridium** acetobutylicum المستخدمة في تخمر الاسيتون ـ البيوتانول في ماء مغلي

لمدة 90 ثانية تقريبا قبل اضافتها الى قاع البيئة السائلة المعادلة بالبخار حديثا • ومن الناحية الاخرى ، فان سبورات الاكتينومايسيتات والفطريات ليست مقاومة للحرارة على وجه الخصوص ولن تقاوم الصدمة الحرارية • لذلك قد يكون من الضروري انبات سبورات هذه الاحياء مسبقا في بيئة خاصة اذا كان هناك سؤال عما اذا كانت السبورات ستنمو في بيئة اللقاح العادية • ولكن عادة لا يعد مثل هذا الانبات المسبق Pregermination ضروريا •

وتحضر المعلقات السبورية للاكتينومايسيتات أو الفطريات باضافة مادة مخففة مناسبة كماء الحنفية المعقم الى الاجار النامية عليه السبورات ، يتبع ذلك حك حر للسبورات بواسطة ابرة ذات عقدة Loop بحيث تصبح السبورات معلقة في المادة المخففة • ومع بعض الاحياء المجهرية قد لا تبتل السبورات بالماء وانما تميل للبقاء كغشاء على سطح الهايفات ، أو أن تطفو على سطح المحول او تتسلق الجدار الداخلي لوعاء النمو بدون ان تعلق في المادة المخففة • ويمكن معالجة هذه الحالة باضافة كمية صغيرة من عامل ترطيب أو ابتلال غير سام مثل لوريل سلفونات الصوديوم الى محلول التخفيف •

وفي المقابل ، فان بعض التخمرات الفطرية الثابتة مثل تخمر حامض الستريك بواسطة الفطر Aspergillus niger يستلزم ان تكون السبورات طافية على سطح البيئة بحيث ان انبات ونمو السبورات سينتج حصيرة خيطية طافية • ويتم هذا بواسطة افراغ المعلق السبوري بعناية على جدران الوعاء المزرعي بحيث أن السبورات تطفو عبر سطح البيئة السائلة ، أو بواسطة رش المعلق السبوري عبر سطح البيئة باستخدام مرشة atomizer . •

وقد تعالج الاكيتنوميسيتات أو الفطريات التي تكون سبورات أو التي تكونها بضعف بطريقة مختلفة بحيث تنقل الهايفات المجزأة الى بيئة اللقاح السائلة • وتكسر الهايفات بالحك بقوة على سطح الاجار باستخدام الابرة ذات العقدة Loop وذلك لتجهيز معلق مائي للهايفات ، أو قد تمزق الهايفات في خلاط Waring blendor أو باية آلة تهشيم مماثلة •

وقد يحدث تلوث أثناء انتاج البادىء ولكنه غير مميز ، أو قد يكون التلوث

كبيرا يسهل ملاحظته ٠ لذلك ينبغي يذل كل المحاولات للكشف عن مستوى التلوث بحيث يكون لقاح أحواض الانتاج خاليا تماما من التلوث ٠

وفي التخمرات التي تستخدم هايفات الاكيتنومايسيتات والفطريات ، فان مستوى عاليا من التلوث البكتيري يسهل ملاحظته في بعض الاحيان على صورة عكارة أو حتى على شكل رغوة ٠

وعادة يتم الكشف عن التلوث بواسطة الاتجاه الى الفحص المجهري للتحضيرات المبتلة أو المصبوغة وكذلك زرع عينات اللقاح على بيئة تسمح بنمو الاحياء المجهرية الملوثة المشكوك بها ٠

وينبغي فحص اللقاح للتخمرات اللاهوائية من ناحية التلوث وذلك بزرعها تحت ظروف تحضين هوائية ولا هوائية وذلك للكشف عن وجود الاحياء اللاهوائية اختيارا facultative anaerobes ٠ وفي بعض التخمرات كتخمر الاسيتون ــ البيوتانول بواسطة البكتريا Clostridium acetobutylicum توجـــد أساليب تخمرية مميزة تزودنا بكيفية معرفة وجود التلوث ٠ ففي خلال نمو هــذا الكائن الحي ، يوجد انتاج اولي لحامض الخليك والبيوتيريك يترافق مع تكوين انزيم تطبعي لتحويل هذه الاحماض الى الاستيون والبيوتانول ٠ وفي نفس وقت انتاج هذه المذيبات السابقة الذكر فان مستويات حامضي الخليــك والبيوتيريك تتناقص بشكل ملحوظ وهذا ما يسمى بانكسار الحامض acid-break ، ويمكن ملاحظة هذه الظاهرة بتسحيح عينات متعاقبــة من اللقاح أو مزرعة الانتاج مــع قلوي مخفف ٠ لذلك فان لقاح هذا الكائن يجب أن يستخدم فقط بعد حدوث انكسار حامضي حاد ، ما دامت الاحياء المجهرية الملوثة تمنع حدوث هذا الانكسار ٠

3 . الاقلمة أو التطبيع Adaptation

عند تحضير لقاح أحد الاحياء المجهرية لاستخدامه في تخمر معين ، قــد يحضر اللقاح بتنمية الكائن الحي المجهري في كمية صغيرة من بيئة الانتاج نفسها ومن ثم التحضين على أمثل ظروف تنمية من حرارة وتهوية و pH وتركيز مواد مغذية ٠ وبعد ذلك يتم بناء اللقاح في سلسلة من النقلات الى بيئات من نفس النوع

وباحجام متزايدة للوصول الى الحجم المناسب لتلقيح بيئة الانتاج الرئيسة ٠

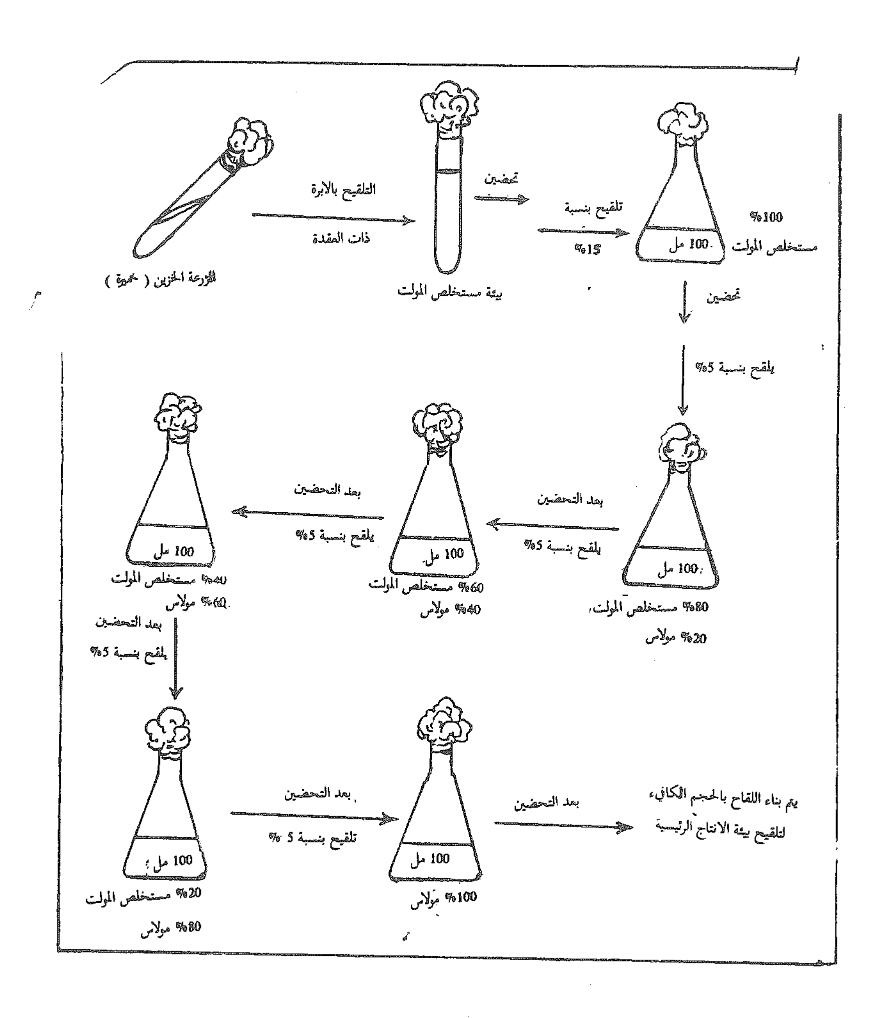
ولكن في بعض الاحيان قد لا تستجيب بعض الاحيان المجهرية لظروف النمو في بيئة الانتاج نفسها أثناء تحضير اللقاح ، وبالتالي فان اللقاح الناتج يكـون ضعيفا وغير قادر على احداث تخمر فاعل في بيئة الانتاج الرئيسة ٠ ولمعالجـة هذه الحالة ، قد تضاف بعض المواد المغذية وعوامل النمو لحث واسراع نمو الكائن الحي المجهري ولتكوين اعداد كبيرة من الخلايا القادرة على انجاز التخمـر فـي حوض الانتاج ٠

وفي أحيان أخرى يجب تعويد الكائن الحي المجهري على الاستفادة من مكونات بيئة الانتاج كمصدر للطاقة والكربون تدريجيا وذلك أثناء بناء اللقاح ، ويطلق على هذا التعويد بالاقلمة أو التطبيع adaptation .

وتجري العملية بتلقيح أنبوبة اختبار أو دورق يحتوي على بيئة النمـو النموذجية لنمو الكائن الحي المجهري وذلك باستخدام المزرعة الخـزين ومن ثـم التحضين على أفضل ظروف تسمح بتزايد عدد الخلايا في المزرعة ٠ وبعد ذلك تأتي مرحلة تطبيع الكائن الحي المجهري لكي ينمو ويتكاثر في بيئة الانتاج تدريجيا بحيث يصل في النهاية الى التطبع على البيئة الجديدة ، اذ يمكن بناء كميـة لقاح تكفي لتلقيح الحجم الكلي لبيئة الانتاج ٠

وعلى سبيل المثال ، عند انتاج خميرة الخباز Baker's yeast من بيئـة المولاس فان الامر يحتاج الى تطبيع سلالة الخميرة **Saccharomyces cerevisiae** على النمو في بيئة المولاس كما في الشكل (1.7) ٠ والعملية تتم بتلقيح انبوبة اختبار تحتوي على بيئة مستخلص المولت malt extract ثـم التحضين على أفضل الظروف ٠ وبعد ذلك يلقح دورق يحتوي على 100 مل من نفس البيئـة بنسبة لقاح تصل الى 5 % بالحجم في البيئة ويحضن على نفس الظروف ٠ وبعد انتهاء التحضين يلقح دورق آخر يحتوي على 100 مل من بيئة تحتوي على نسبة عالية من مستخلص الخميرة ونسبة منخفضة من المولاس ويحضن ٠ وتعاد العملية بحيث أن نسبة مستخلص الخميرة في الخليط تتناقص وفي نفس الوقت تتزايـد نسبة المولاس لغاية الوصول الى بيئة تحتوي على 100 % مولاس ٠ ومن هـــذا

الدورق الاخير يمكن مضاعفة حجم اللقاح المتكون حتى الوصول الى الحجم المناسب والكافي لتلقيح بيئة الانتاج الرئيسة ٠ وبذلك تكون الخميرة قد تطبعت وتأقلمت على النمو في بيئة المولاس وتكون نشطة وفعالة في الاستفادة من مكوناته لاعطاء الناتج المرغوب ٠



الشكل (1.7) ـ خطوات تطبيع الخميرة لانتاج اللقاح

الفصل الثامن

التقليب والتهوية في التخمرات الصناعية

Agitation and Aeration in Industrial Fermentations

1 . مقدمة

2 . المزارع الساكنة

3 . تخمر الدورق المرجوج

4 . التقليب والتهوية الميكانيكية

5 . تداخل التقليب الميكانيكي مع التهوية

6 . التصميم الاقتصادي للمخمر

تكوين الرغاوي وطرق السيطرة عليها



1 . مقدمة Introduction

لقد استخدمت تصميمات عديدة لمعدات التخمر من أجل انتاج مواد أيض الاحياء المجهرية ٠ فالمخمر أو وعاء التخمر الذي تجري فيه العملية قد يكون انبوبة اختبار ساكنة Static test tube للمزارع البكتيرية السائلة ، أو دورقا مزرعيا يحتوي على فطر ينمو كحصيرة mat على سطح السائل المغذي أو دورقا هزازا أو مرجوج shake-flask تنمو فيه الاحياء المجهرية مغمورة في كمية صغيرة من بيئة التخمر التي تقلب أو تحرك agitated بالرج الميكانيكي للدورق ، أو اشكالا واحجاما لاوعية مزج يتم رجها وتهويتها ميكانيكيا بطريقة ما بحيث تسمح بغمر النمو الميكروبي في بيئة التخمر ٠

ان وظيفة المخمر هو توفير ظروف بيئة مثلى لتكوين الناتج الايضي المطلوب وباكبر كمية ممكنة ٠ وهذا يتطلب توفير مواد قابلة للاستهلاك كالنتروجين والكربون والعناصر المعدنية ، وعوامل غذائية مساعدة في بيئة يتم تهويتها بنسب صحيحة ودقيقة في الوقت المناسب ويحافظ عليها من خلال قيم مثلى للـ pH وجهد الاكسدة والاختزال ودرجة الحرارة ٠ وتكون العمليات الايضية الجارية في المخمر معقدة ، ويتم تكييفها بواسطة نظام التقليب agitation والتهوية aeration المستخدم ٠

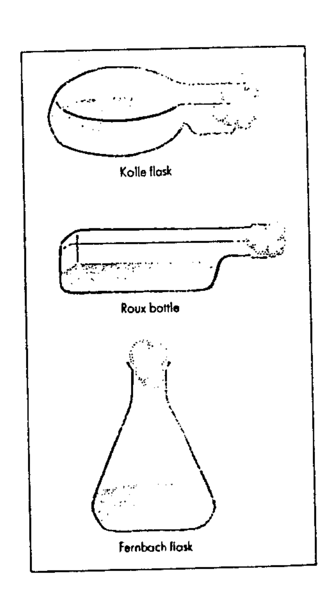
ان التجارب على النطاق الانتاجي في التخمرات الصناعية تكاد تكون محدودة ومكلفة ، وبالتالي فمن المعتاد تصميم نموذج لوحدة انتاجية بحيث يمكن اجراء عدد كبير من التجارب بدون فقد في السعة أو الطاقة الانتاجية ٠ ومن الضروري جعل ظروف التشغيل لهذه الوحدة الانتاجية التجريبية مشابهة لما يحدث في المصنع الانتاجي الواسع النطاق ٠ لذلك من الضروري مناقشة العوامل المؤثرة في التقليب والتهوية في أوعية مختلفة الانواع والاحجام ٠

ان التشابه الدقيق في أداء العمل بين أوعية المزج المختلفة الاحجام يكون غير ممكن ، لذلك على صانع النموذج أن يعمل عددا من الافتراضات قبل العمل ٠ وفي العادة يتم التأكيد في كل المخمرات ، وبصرف النظر عن الحجم ، على بقاء نسبة جميع الابعاد المناسبة والوثيقة الصلة بالموضوع واحدة ٠ وبالرغم من افتقار

معرفتنا للميكانيكية المستخدمة ، الا أنه من الممكن استخدام طرائق رياضية لتحليل هذه الابعاد · مثل هذا الاستخدام لزيادة نطاق التقليب يسمح بحساب المتغيرات المهمة (كالطاقة الداخلة وسرعة التقليب وقطر المقلب) ، ولكن هذا يمكن القيام به فقط بالنسبة للاوعية التي تمنع التداخل بالكامل fully baffled vessels في منطقة السريان المضطرب أو الدوامي turbulant flow . · ويعود وجـود الدوامات الى مانع التداخل غير الكامل أو غير الموجود والذي يظهر مشاكل صعبة الحـل ·

2 . المزارع الساكنة

من احدى طرائق التخمر التي لا تتضمن مشاكل عن الطاقة الداخلة هـي طريقة المزارع الساكنة أو السطحية التي استخدمت في الابحاث المبكرة عن نواتج الفطريات · ويوضح الشكل (1.8) دوارق نموذجية للمزرعة الفطرية مناسـبة للمزارع السطحية فيبيئة سائلة ذات عمق 2 سم تقريبا ·



الشكل (1.8) دوارق نموذجية مصممة لاعطاء أكبر مساحة سطحية من أجل التهوية

ويوفر أي وعاء معقم طبقة ضحلة مناسبة من البيئة يكون ملائما لهذه الطريقة ٠ وفي السابق كانت وحدات الانتاج تبنى من أنواع مختلفة من القناني أو الصواني ٠ اذ يستلم الجزء العلوي من غشاء المايسليوم مقدارا وفيرا من الاوكسجين مع نقص في المواد المغذية ، ولكن عند السطح السفلي للمايسليوم تكون الظروف على عكس ذلك ، حيث تكون المواد المغذية غزيرة في حين يكون الامداد من الهواء محدودا ٠

ويوفر دورق المزرعة الفطرية عددا غير محدد تقريبا من ظروف التخمر المتغيرة ، تتفاوت بين غزارة المواد المغذية الى النقص في المواد المغذية ، وبين تجهيز وفير للاوكسجين الى تعايش لا هوائي anaerobiosis جزئي ٠ ولهذه الاسباب فان انتاج مواد أيض الفطريات قد يتم في بعض الاحيان بسهولة كبيرة في دوارق المزرعة الفطرية ، وان كان بنواتج أقل من ذلك المتحصل عليه من ظروف أكثر خصوصية ولربما ظروف غير متوافقة مع المخمرات الاكثر تعقيدا ٠ ويمكن تفسير ذلك بطريقة أخرى حيث تحاكي دوارق المزرعة الفطرية التخمر المستمر ذا المراحل المتعددة multi-stage continuous fermentation اذ تعطي المراحل الهوائية الابتدائية تدريجيا مكانا للظروف اللاحقة من نقص التهوية ٠

وتعقم الدوارق المزرعية المحتوية على بيئة التخمر ثم تبرد وبعد ذلك تلقح بهدوء ويفضل أن يتم تلقيحها بالسبورات بحيث يطفو اللقاح على سطح السائل المغذي ٠ وعندما تنبت السبورات تكون جزءا من النمو ، وهذه الاخيرة تندمج مع بعضها مكونة غشاء مسطحا الذي قد يصبح ملتفا على سطح السائل ٠ وينبغي تجنب تحكير أو تشويش الدوارق المزرعية وذلك لمنع الغشاء الفطري من الغوص ٠

ان النمو السطحي لدوارق المزرعة الفطرية يكون مشابها للنمو على بيئة الاجار ، اذ تتواجد السبورات عند السطح البيني بين الغشاء الفطري والهواء في حين يتواجد الميسليوم الخضري عند السطح البيني بين الغشاء الفطري والبيئة ٠ وبالتالي تعد هذه البيئة مفيدة وذات قيمة في زرع الفطريات التي لا تنمو عادة بصورة جيدة في المزارع المغمورة مثل بعض البازيديوميسيتات basidiomycetes

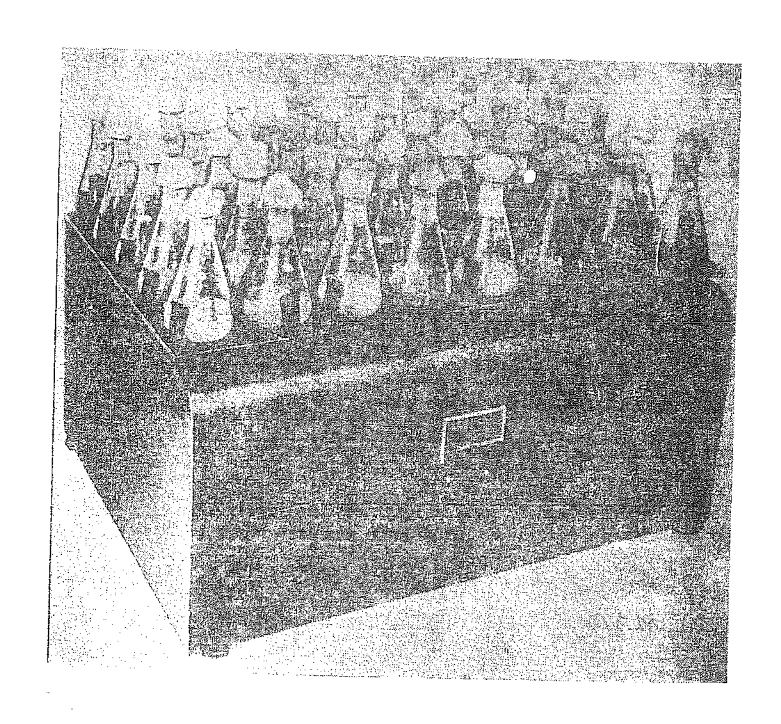
3 . تخمر الدورق المرجوج Shake-flask Fermentation

تعد طريقة المزرعة العميقة أو المغمورة للتخمر الهوائي من أبتكار الشركات الصيدلانية الامريكية المتزعمة للانتاج التجاري للبنسلين خلال السنوات الاولى من الحرب العالمية الثانية • وفي السابق اعتقد العديد من الخبراء أن الفطريات لا يمكن تنميتها مغمورة في بيئة سائلة مهواة • وعليه فان طريقة الدورق المرجوج أو المهزوز shake-flask هي طريقة مشابهة تسمح بتخمرات هوائية مختبرية النطاق والتي يمكن اجراؤها بسرعة وبكميات قليلة من المواد المغذية ، وبذلك تؤدي الى تقييم السلالات الطفرية mutant strains وكذلك البحث عن بيئات مناسبة •

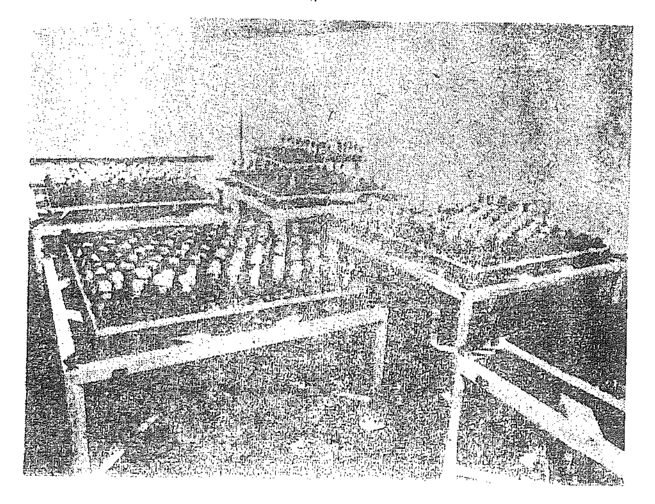
ودورق الرج هو دورق مخروطي (يتفاوت حجمه عادة بين 100 , 500 مل) والذي يمكن تحريكه كلية بوسائل ميكانيكية حول محيط دائرة (عادة قطرها 5 سم) مع تردد مقدر سلفا (قد يصل الى 220 دورة في الدقيقة) في حين يحافظ على المواقع النسبية لجدر الدورق والمنصة الحاملة له بلا تغيير • وهذه الحركة الرحوية تقلب وترج السائل دون ان تبلل السدادة القطنية ، وتزيح القوة النابذة centrifugal force على بيئة التخمر السائل الى طبقة رقيقة نسبيا مهواة بواسطة الانتشار خلال سطح السائل • وعادة تحتوي دوارق الرج ذات سعة 250 مل على 25—60 مل من البيئة ، ويثبت عمق السائل تبعا لكمية التهوية المطلوبة ، في حين لا تحتوي دوارق الرج سعة 100 مل على كمية تزيد عن 10—20 مل من البيئة • وتسمى الماكنة المستخدمة في تحريك دوارق الرج بالرجاج أو الهزاز الدوراني rotary shaker , ، ويبين الشكل (2.8) والشكل (3.8) هزازات ميكانيكية تؤدي حركة دورانية أو رحوية لزيادة تهوية المزارع أثناء فترة الحضانة ويمكن السيطرة على التقليب والتهوية في دوارق الرج باحدى الطرائق الثلاث التالية :ــ

أ) تتناسب التهوية والتقليب عكسيا مع العمق (وبالتالي مع حجم السائل) في الدورق المرجوج •

ب) تتناسب التهوية والتقليب طرديا مع كل من سرعة الدوران ومسافة القلف length of through •



الشكل (2.8) هزاز ميكانيكي ذو الحركة الدورانية



الشكل (3.8) هزازات ميكانيكية

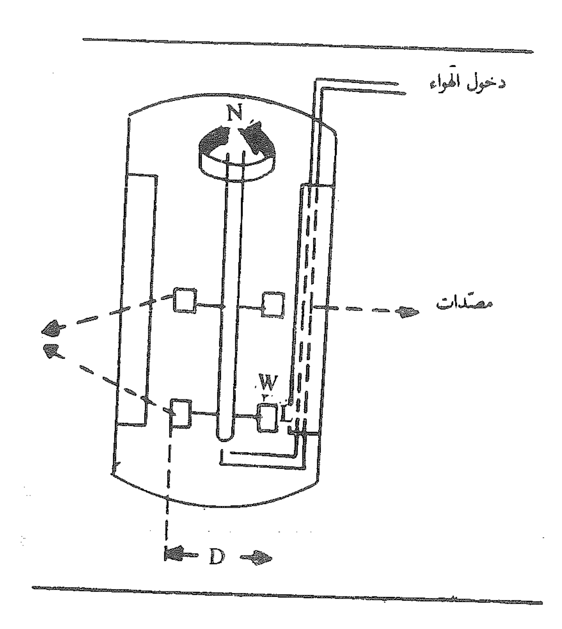
جـ) تزيد الوسائل المانعة للتداخل baffles أو أية وسائل ميكانيكية من درجة التقليب والتهوية بواسطة احداثها للاضطراب ·

وتختلف ميكانيكية امتصاص الاوكسجين وأساليب السريان في دوارق الرج غير المجهزة بوسائل مانعة التداخل عن تلك الموجودة في المخمرات المحركة تحريكا ضئيلا Stirred fermentors · وتؤدي حركة الهزاز الى سريان السائل حول الجدار الداخلي لدورق الرج · كما تؤدي القوة النابذة المقدرة بواسطة سرعة الدوران ومسافة القذف ، بالسائل لكي يصبح على شكل طبقة رقيقة يتحدد عمقها بواسطة قيم القوى المبذولة · وينفذ الهواء بحرية خلال السدادة القطنية للدورق لتهوية الطبقة السائلة بواسطة الانتشار ، وبكفاءة تعتمد على عمق السائل ·

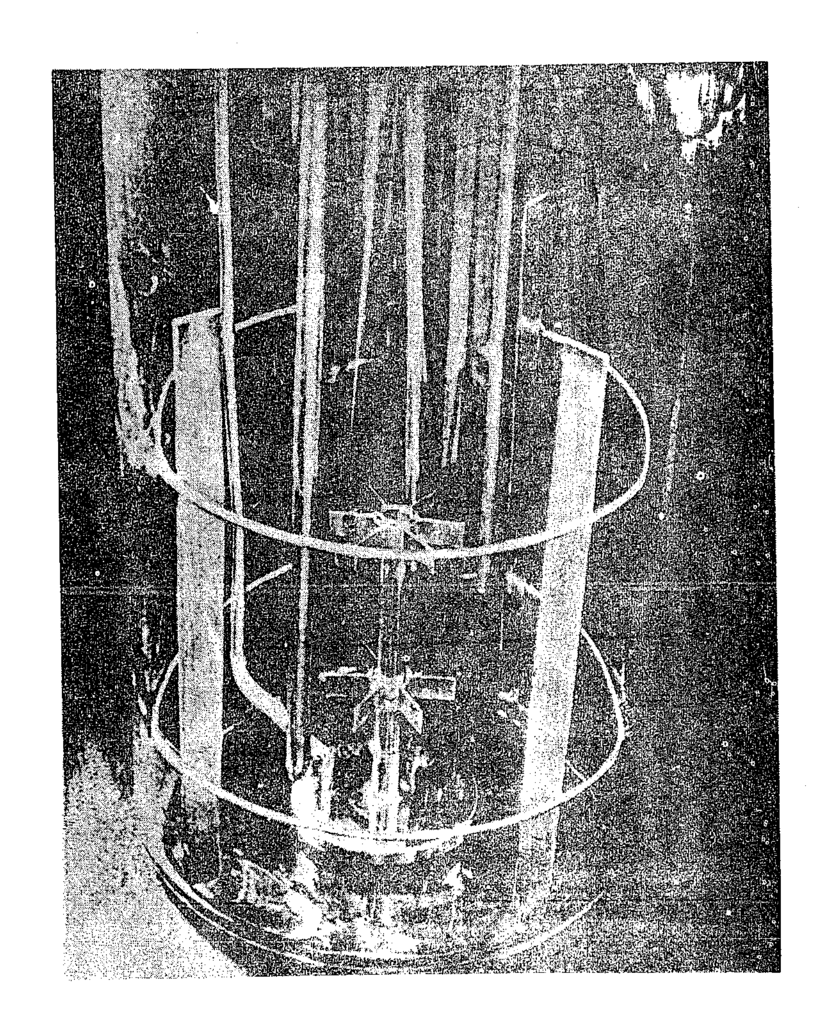
وقد تم تجربة تصاميم أخرى من الهزازات منها الهزاز الترددي reciprocating shaker (الذي يتردد الى امام والى وراء) مع نفس حركة وسرعة هزاز بالادينو Paladino Shaker وله كفاءة تهوية مماثلة ، ولكنه اقل فائدة وذلك لحدوث رش للبيئة على جدار الدورق وهذا في النهاية يصبح مغطى بالمزرعة السطحية للفطر · ويميل الهزاز الترددي الى تبليل السدادات بالبيئة واذا حدث ذلك ، ينبغي تقليل التهوية ويصبح عقم sterility المرشح القطني الموجود في عنق الدورق غير مضمون ·

4 . التقليب والتهوية الميكانيكية Mechanical Agitation and Aeration

يبين الشكل (4.8) رسما تخطيطيا لمخمر نموذجي يقلب ويهوي ميكانيكيا بحيث يجهز درجة عالية من الاضطراب أو الدوامات في حين يوضح الشكل (5.8) صورة جانبية لنفس المخمر · ويقلب المخمر بواسطة الدوران عند عدد N من الدورات لكل دقيقة بدوارات توربينية متعددة الشفرات قطرها D ولها شفرات عرضها W وارتفاعها L · وتوضع مصدات مانعة لتدفق الغازات ، تشغل مسافة قدرها $\frac{1}{10}$ تقريبا من قطر الوعاء ، عموديا على الجدار وبطريقة ما بحيث أن أربعة منها على الاقل تكون مرتبة بانتظام في كل مخمر ·



الشكل (4.8) رسم تخطيطي لمخمر مقلب ومهوى



الشكل (5.8) صورة جانبية لخزان مقلب ومهوى

ان معظم التخمرات الهوائية تحتاج الى ادخال هواء [illegible]
وعاء التخمر . وأسهل وسيلة لتعقيم الهواء هي بامراره خلال [illegible]
من الصوف الزجاجي ، ودقائق الكربون ، ويعطي الهواء المعقم [illegible]
حجز الاحياء المجهرية الموجودة في الهواء . ويمر هذا [illegible] الهواء خلال
أنابيب معقمة الى قعر المخمر تحت الشفرات الدوارة [illegible] يمر الهواء
خلال رشاش sparger [illegible] يصمم بأشكال مختلفة ولكن غالبا ما يتألف من انبوب
بفتحات ضيقة (0.04 — 0.08 سم او اكبر) . وفتحات ذات احجام اصغر من هذا
الحجم تحتاج الى ضغط هواء كبير لتكوين فقاعة هوائية معقولة . والرشاشات في
مخمرات نمو الاحياء المكونة للمايسيليوم غالبا ماتستخدم فتحات حجمها $\frac{3}{4}$ انج
وذلك لمنع انسداد الفتحات نتيجة نمو الهايفات . وتنتشر فقاعات الهواء الخارجة
من الرشاش خلال البيئة بفعل شفرات الدوار المركبة اعلى الرشاش . واذا كان
الدوار يدور بسرعة كافية لحدوث دوامة ملحوظة في البيئة ، فان فقاعات الهواء
تهرب مباشرة خلال الطبقة الضحلة من البيئة اعلى الدوار الى حيز الفراغ الراسي

لذلك فان معدل دوران شفرة الدوار ينبغي ان يكون كبيرا الى درجة يسمح
بمزج جيد للبيئة ولكن ليس كبيرا بالدرجة التي تؤدي الى هروب الهواء من الرشاش
بدون ذوبانه في البيئة لكي يستخدم [illegible] الحي المجهري .

وكلما كانت فقاعات الهواء الناتجة من الرشاش صغيرة ، وكانت المساحة
السطحية الكلية للفقاعات كبيرة زاد احتمال مرور اوكسجين الهواء حول حدود
الفقاعة وذوبانه في سائل البيئة . نظرا لكون الهواء المعقم مادة مكلفة في التخمر
الصناعي لذا ينبغي تثبيت حجم الفقاعات الهوائية لتعطي اكبر تهوية ممكنة بدون
زيادة التكاليف الكلية للتخمر .

وفي بعض احواض التخمير الكبيرة جدا لايستخدم دوار ، وانما تحرك البيئة
الاندفاع المباشر لفقاعات الهواء من الرشاش الموجود في [illegible] . وهذه
الاحواض تكون ذات تصميم خاص وهي عادة لا تحتوي على [illegible] تدفق الغازات .

وفي اي مخمر ، عادة يكون حجم رشاش فقاعات الهواء ثابتا ولايمكن تغيير معدل سريان الهواء خلال التخمر بتغير حجم فتحات الرشاش الا انه بالامكان تغيير معدل سريان الهواء بتغير الضغط على خط الهواء • ان القدرة على تغيير معدلات سريان الهواء التي تقاس عادة باحجام من الهواء لكل حجم من البيئة في الدقيقة الواحدة قد تكون من الاهمية في التخمرات التي يتطلب فيها معدل ابتدائي عال من التهوية وذلك لبناء أو تكوين مجموع خلوي كبير ، بعده يتطلب الامر ظروف تخمر لا هوائية •

5 . تداخل التقليب الميكانيكي مع التهوية

ان مناقشة تأثير التقليب في التهوية قد تكون تقريبية بسبب تغير الخواص الفيزياوية (كاللزوجة والكثافة) لبيئة التخمر خلال فترة التخمر • علاوة على ذلك فان اللزوجة الظاهرية للعديدة من بيئات التخمر تتفاوت مع نوع وشدة التقليب (اي انها محاليل غير نيوتونية Non-Newtonian fluids)

وقد لوحظ في التطبيق الصناعي ان التقليب يحدد لدرجة كبيرة من كمية الناتج في التخمر الهوائي • وعند اي معدل لسريان الهواء يتجاوز الحد الادنى الحرج ، فان كمية الناتج تنخفض عندما يقل التقليب • وعلى العكس فان تناقصا مماثلا في سريان الهواء عند سرعة تقليب ثابتة لها تأثير بسيط على كمية الناتج ولهذا السبب فقد اقترح ان بالامكان التعبير عن التقليب والتهوية بصيغة طاقة كلية داخلة لكل وحدة حجم من البيئة • وهذا يقتضي ان يكون الشغل المبذول لكل وحدة زمن (طاقة داخلة) على كل وحدة حجم من البيئة بواسطة سريان الهواء كبيرا في المخمرات الطويلة مقارنة بالمخمرات القصيرة اذ تحتاج الاولى بالمقابل الى طاقة مقلب اقل •

ان ميكانيكية العملية التي بواسطتها يمر الاوكسجين من فقاعات الهواء عبر البيئة الى الكائن الحي المجهري تتم حسب نظرية الانتشار خلال الاغشية الرقيقة • ومن الضروري افتراض تواجد غشاء رقيق للمادة الثابتة نسبيا عند السطح البيني بين محلولين غير متماثلين ، حتى ولو كانت الكمية الرئيسة في حركة مضطربة

او دوامية . وبالتالي يتم نقل المادة من وجه الى اخر بميكانيكيتين : الحركة للسائل وانتشار الجزئيات خلال الغشاء الراكد نسبيا .

وينبغي لجزئيات الاوكسجين في فقاعة الهواء أن تعترض عدة أغشية رقيقة لتصبح سهلة المنال من قبل الاحياء المجهرية النامية في البيئة :

(1) الغشاء الغازي عند محيط الفقاعة الهوائية ، ولهذا الغشاء تاثير بسيط في معدل ذوبان الغازات القليلة الذوبان مثل الاوكسجين والنتروجين .

(2) غشاء السائل عند السطح البيني للغاز ـ السائل .

(3) غشاء السائل عند السطح البيني للسائل ـ الكائن الحي المجهري وليس لهذا النوع تاثير يذكر في مرور الاوكسجين ، اذ وجد نتيجة للتجارب ان معدل التنفس لاغلب الاحياء المجهرية يكون مستقلا عن تركيز الاوكسجين المذاب . وبالتالي هناك تركيز ادنى حرج وهذا قد يكون اقل من $\frac{1}{10}$ من تركيز التشبع للاوكسجين في البيئة .

لذلك فان للمقلب ثلاثة وظائف هي : ـ

(1) تقليل حجم فقاعات الهواء وبذلك يزيد من مساحة السطح البيني المتيسرة لنقل الاوكسجين .

(2) ابقاء السائل في حركة وذلك لجعل الاوكسجين المذاب والمواد المغذية متيسرة للكائن الحي المجهري .

(3) الابقاء على درجة حرارة منتظمة .

6 . التصميم الاقتصادي للمخمر

بصورة عامة يمكن تقسيم تخمرات الاحياء المجهرية الى مجموعتين : الاولى تحتاج الى تهوية عالية والثانية تحتاج الى تهوية قليلة . فتخمرات الاحياء المجهرية التي تتطلب ضغطا منخفضا من الاوكسجين micro-aerophilic (مثل : انتاج الايثانول 2 , 3 ــ بيوتاندايول ، والاسيتون) تحتاج فقط الى تقليب كاف للسيطرة على درجة الحرارة والتبادل الملائم للمواد الغذائية بين البيئة والكائن الحي المجهري .

فالطاقة المجهزة بواسطة الهواء المضغوط تكون دائما كافية لهـذا الفرض وبالتالي يعد التحريك الميكانيكي غير ضروري الا خلال دورة التعقيم ٠

والتخمرات التي تحتاج الى تهوية عالية (مثل : انتاج السيترولات واغلب المضادات الحيوية) يجب تغذيتها بطاقة كافية لابقاء سيطرة متتظمة لدرجة الحرارة ولكسر فقاعات الهواء ، وللمحافظة على تبادل كاف للمواد الغذائية بين البيئـــة والكائن الحي المجهري ولمنع تكوين مناطق راكدة في البيئة (مثل : قرب جـدار المخمر) ٠

علاوة على ذلك يجب ان تكون الدوارات متباعدة نوعا ما وعموديا بحيث لاتتداخل اساليب دورانها ، ولكن يجب ان تكون قريبة من بعضها على نحو كـاف لتجنب تكوين مناطق راكدة في البيئة ٠

وخلال طور النمو لاكثر عمليات التخمر الصناعي تحدث زيادة في اللزوجة الظاهرية (الصلابة rigidity) للبيئة التي تميل لتكوين مناطق راكدة ، وهذا سيخفض من الاهتياج وبالتالي يقلل من كفاءة التهوية ٠

وخلاصة القول ، فان الوصول لاعلى انتاج في أية عملية تخمرية يتطلـب تجاوز مجموع القوى لكل وحدة حجم ممتصة بواسطة البيئة من المقلب ومن الهواء لقيمة صغرى معينة ٠ وتحدد هذه القيمة التقريبية أولا بواسطة تجارب صـغيرة النطاق قبل تطبيقها على عمليات الانتاج الصناعي الواسع النطاق ٠

7 ٠ تكوين الرغاوي وطرق السيطرة عليها **Foaming and its control**

تسبب التهوية والتقليب في البيئات السائلة في تكوين الرغوة ٠ ويحـدث ذلك خصوصا في البيئات المحتوية على مستويات عالية من البروتينات أو الببتيدات ٠ وعلى العكس ، فان البيئات المتكونة اساسا من مكونات لا عضوية وسكريات نقية نسبيا تكون أقل احتمالية في احداث الرغـاوي ٠ فالبكتريا البروتيوليتية (أي البكتريا التي تكسر البروتينات الى ببتيدات ومواد أخرى) تسبب مشاكل رغـوة خطيرة جدا ، وذلك لان الرغوة التي تعود للببتيدات تكون ثابتة تماما ٠

وفي الحقيقة ، في التخمرات التي تستخدم أحياء مجهرية لا تسبب دائما مشاكل نتيجة لتكوينها الرغاوي على بيئات عالية البروتين ، فان ظهور رغوة ثابتة قد يكون دليلا على حدوث تلوث بواسطة هذه الاحياء المجهرية . وعلى أية حال ، يجب السيطرة على الرغوة اذا أريد اجراء تخمر بطريقة مناسبة . واذا فشل التحكم بالرغوة ، فانها قد ترتفع الى الفراغ الرأسي للمخمر وتجبر على الخروج منه مع الهواء المستهلك . وغالبا ما تسبب هذه الحالة في تلوث التخمر من الاحياء المجهرية الملتقطة بواسطة كسر بعض الرغاوي التي بالتالي تسيل ثانية الى المخمر ، **الشكل** (6.8) .

ويسبب الرغو المفرط مشاكل اخرى للتخمر . وفي أشد الحالات ، فان حجما كبيرا من البيئة قد ينفذ من المخمر على شكل رغوة . كما ان الرغوة الشديدة تعيق التهوية لهروب الغاز الى الفراغ الرأسي .

ان الطريقة المعتادة للسيطرة على الرغاوي هي اضافة مواد مانعة للرغاوي antiform agents **الشكل** (7.8) ، بالرغم من أن شفرة دوار اضافية مركبة عاليا في المخمر قد تكون في بعض الاحيان مؤثرة في السيطرة على الرغاوي .

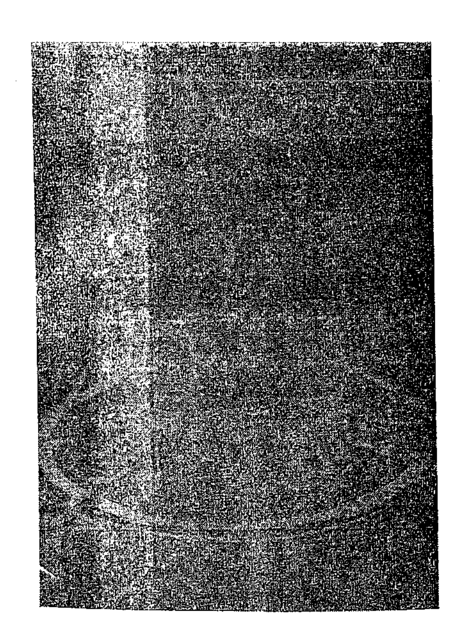


وتخفض المواد المانعة للرغاوي من التوتر السطحي وبالتالي تقلل من ثبات فقاعات الرغاوي في عملية التخمر بحيث تؤوي الى انفجارها . وقد تضاف المواد المانعة للرغاوي عند توليف البيئة (قبل التعقيم) ، أو قد تضاف بعد التعقيم أو خلال عملية التخمر .

ويوجد نوعان من المواد المانعة للرغاوي هما :ـ

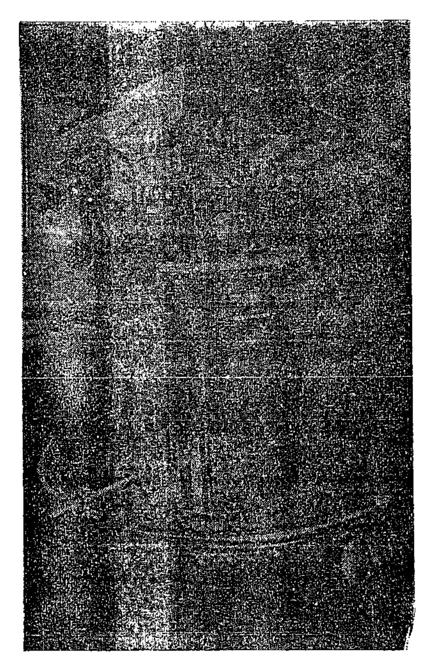
1.7 المواد المانعة للرغاوي الخاملة Inert antifoam agents

ومن أمثلة هذه المواد مركبات السليكون المختلفة والتي تعد الوسيلة المثالية للسيطرة على الرغاوي ، ولكن عموما تكون هذه المواد غالية جدا عند استخدامها في التخمرات الصناعية ذات النطاق الكبير . والتأثير الوحيد لهذه المركبات في التخمر يتضح من كونها تتحكم بتكوين الرغوة ، وانها لا تستهلك من قبل الاحياء المجهرية اضافة الى كونها غير سامة . فقد تضاف الى بيئة التخمر عند توليفها قبل التعقيم ،



الشكل (6.8)

رغوة فائضة من المخمر



الشكل (7.8)

السيطرة على الرغوة باضافة

مضادات الرغاوي

الفصل التاسع

التعقيم Sterilization

1 . مقدمة

2 . الطرق الطبيعية أو الفيزياوية للتعقيم

2 . 1 . الحرارة

2 . 2 . الترشيح

2 . 3 . الاشعاع

3 . الطرق الكيمياوية للتعقيم

3 . 1 . الاحماض

3 . 2 . القلويات

3 . 3 . الكحولات

3 . 4 . الفينول ومركباته

3 . 5 . اليود

3 . 6 . الكلور ومركباته

3 . 7 . المعادن الثقيلة ومركباتها

3 . 8 . الصابون والمركبات الخافضة للتوتر السطحي

3 . 9 . الفورمالدهيد

3 . 10 المضادات الحيوية

4 . اختبار المعقم

5 . الطهارة

5 . 1 . النظافة

5 . 2 . درجة حرارة منتظمة

5 . 3 . الرطوبة المنظمة

1 . مقدمة Introduction

يقصد بالبيئة المعقمة خلوها من الكائنات الحية ، في حين ان التخمر المعقم يعني استخدام بيئة تحتوي على الكائن الحي المرغوب فقط الذي يقوم بالتخمر . وعلى الرغم من ان الحالة المعقمة هي حالة مطلقة فان طرق اختيار المعقم تكـــون نسبية . فقد تكون البيئة ملوثة ولكن التلوث يبقى غير مكتشف لعدم توفـــــر الظروف الملائمة لنمو الاحياء الغريبة الملوثة .

وقد تعاني بيئة التخمر الملوثة من عدة اشياء منها : —

(1) تحول المواد الغذائية المتيسرة الى نواتج غير مرغوبة

(2) تغير الظروف البيئية ، بحيث ان الكائن الحي التخمري يكون غير قادر على الانتاج او ان البيئة غير قادرة على الاحتفاظ بالناتج المرغوب .

(3) قد تتكون انزيمات تهدم الناتج المرغوب .

ولذلك يعد التعقيم من الامور المهمة الواجب مراعاتها في نجاح اي تخمر صناعي . ويجري التعقيم بطرق عدة منها طبيعية ومنها كيمياوية ، وتتوقف طريقة التعقيم المستخدمة على نوع الناتج المرغوب ونوع الكائن الحي المجهري وطبيعة البيئـــة الغذائية علاوة على عوامل عديدة اخرى .

2 . الطرق الطبيعية او الفيزياوية للتعقيم Physical Methods of Sterilization

2 . 1 الحرارة Heat

قبل ان نتكلم عن التعقيم الحراري وطرقه المختلفة يحسن بنا ان نتعرف على اصطلاحين سائدين في هذا المجال وهما درجة الحرارة المميتة Thermal Death Point والوقت الحراري المميت Thermal Death Time . فالمصطلح الاول يشير الى اقل درجة تهلك فيها خلايا معلق ميكروبي خلال عشر دقائق من تعرضها لهذه الدرجة . وهذا المصطلح بتعريفه السابق لاشك وانه مضلل الى حد ما وذلك لوجـــود لفظ (درجة Point) اذ من المعروف أن الخلايا الميكروبية (كالبكتريا) في مجمـــوع معين لاتموت او تهلك جميعا في وقت واحد وانما يحدث الموت على مدى فترة من الزمن . والمصطلح الثاني لاشك وانه يشير الى اقل وقت يلزم لقتل الخلايا الميكروبية عند تعرضها لدرجة حرارة معينة .

ومن الملاحظ ان كلا من المصطلحين يبين ان هناك علاقة بين وقت التعريض للحرارة ودرجة الحرارة اللازمة للقتل · ففي الحالة الاولى يثبت الوقت وتتغير درجة الحرارة ، في حين في الحالة الثانية تثبت درجة الحرارة ويتغير وقت التعريض ·

وينبغي عند القيام بتحديد اي من التقديرين المذكورين مراعاة الظروف البيئية الاخرى والتي تؤثر كبيرا في النتائج المتحصل عليها · ومن هذه الظروف قيمة pH البيئة وتركيبها الكيمياوي ، ونوع الكائن الحي المجهري ، وتركيز المعلق الميكروبي ، وعمر الخلايا الميكروبية · اذ أن كلا من هذه العوامل قد يؤثر في درجة مقاومة الخلايا الميكروبية للحرارة ·

وتختلف الكائنات الحية المجهرية في مقاومتها للمعاملات الحرارية ، فقسم منها يهلك بمعاملة حرارية على درجة حرارة متوسطة وقسم اخر يقاوم الحرارة العالية وقسم اخر قد تهلك خلاياه الخضرية ولكن سبوراته الداخلية تقاوم الحرارة العالية ومن المعروف ان هناك معاملتين حراريتين رئيستين : ــ

الاولى : ــ رفع درجة حرارة المعلق الى درجة حرارة أقل من درجة حرارة الغليان ولمدة معينة من الزمن · وهذه المعاملة اوجدها باستور Pasteur ويطلق عليها البسترة Pasteurization ويمكن اجراؤها بعدة طرق تعتمد اساسا على درجة الحرارة والمدة الزمنية المستغرقة ·

اذ كلما ارتفعت درجة الحرارة المستخدمة في المعاملة انخفضت المدة الزمنية اللازمة لها والعكس صحيح · وهناك نوعان من البسترة ، بسترة بطيئة تعتمد على استخدام درجة حرارة منخفضة (62-65 مْ) لمدة طويلة من الزمن (30 دقيقة) وبسترة سريعة تعتمد على استخدام درجة حرارة مرتفعة لمدة قصيرة من الزمن ·

ان هذه المعاملة الحرارية لاتؤثر بدرجة متساوية في انواع الاحياء المجهرية كافة الا انها تقتل غالبية الخلايا الخضرية لهذه الاحياء وبعض السبورات غير المقاومة للحرارة في حين نجد ان بعض سبورات البكتريا تقاوم هذه البسترة ولاتهلك نتيجة المعاملة · لذلك فان اجراء عملية البسترة لغرض التعقيم يكون مقصورا على بعض التخمرات التي تكون كائناتها الحية غير مقاومة لها او بالتعاون مع طريقة

تعقيم أخرى كخفض الـ (pH وخاصة اذا أدخلنا في الاعتبار التكاليف الناجمة عن التعقيم على اقتصاديات التخمر ٠

الثانية :ـ رفع درجة حرارة المعلق الى درجة حرارة اعلى من درجة الغليان ولمدد زمنية تتفاوت حسب طبيعة البيئة ونوع الكائن الحي المجهري الموجود ٠ وعادة تجري هذه المعاملة التعقيمية تحت ضغط مرتفع ٠

ان استخدام الحرارة الناتجة من جو متشبع ببخار الماء تحت ضغط مرتفع يعد احسن الطرق الممكن الاعتماد عليها في تعقيم المنتجات الغذائية كاللحوم والخضروات المعلبة والتي تحمل اعدادا كبيرة من البكتريا المكونة للسبورات التي لا يمكنها تعقيمها عن طريق البسترة ، وكذلك في تعقيم البيئات الغذائية المحضرة لتنمية الاحياء المجهرية في المختبر او لتعقيم البيئات الغذائية المستخدمة في التخمرات الصناعية ٠

والبخار تحت ضغط يوفر درجة من الحرارة اعلى من تلك التي توفرها عمليات الغليان تحت الضغط الجوي العادي ، كما ان لها القدرة على اجراء التسخين السريع وتغلغل الرطوبة داخل الخلايا مما تؤدي الى تغيير طبيعة البروتين الخلوي ، الامر الذي يؤدي الى موت الاحياء المجهرية ٠

والجهاز المستخدم في تعقيم بيئات المختبرات الميكروبيولوجية والبيئات المستخدمة في تحضير البادئات أو اللقاحات يطلق عليه المعقم البخاري (الاتوكلاف Autoclave) وهو عبارة عن وعاء من الصلب ذي جدار مزدوج له غطاء محكم القفل يوصل بمصدر لتوليد بخار الماء أو يولد بداخله البخار بالتسخين الكهربائي للماء بطرق أخرى ، ويشترط عند تشغيل المعقم البخاري التثبت أولا من خروج الهواء واحلال بخار الماء محله ثم يغلق الجهاز وتزداد كمية البخار حتى يصل الضغط الداخلي الى الحد المطلوب عندها تكون درجة الحرارة قد ارتفعت الى الدرجة الملائمة للتعقيم ٠ ومن الجدير بالذكر أن الخلايا والسبورات لا تموت من تأثير الضغط المرتفع ، بل من تأثير الحرارة الرطبة للبخار تحت ظروف الضغط المرتفع ٠ وتختلف مدة المعاملة تبعا لطبيعة وتركيب البيئة ونوع وعدد الاحياء المجهرية الموجودة ٠

وهناك انواع عديدة من المعقمات البخارية وباحجام مختلفة ولكنها لا تستخدم في تعقيم الكميات الكبيرة من البيئات الغـذائية المستخدمة في الانتـاج للتخمرات الصناعية ، وانما قد تستخدم في تعقيم البيئات الخاصة بتحضير البادئ أو اللقاح الى حد ما ، ولكن في حالة البادئات الكبيرة الحجم فانه يصعب تعقيمها في مثـــل هذه الاجهزة ·

في حالة البيئات الكبيرة الحجم يضخ بخار حي تحت ضغط مرتفع جـــــدا وذلك بامراره خلال فتحة الدخول الى المخمر ، أو في بعض الاحيان قد يمرر البخار في ملفات تسخين على الجدران الداخليـــة للمخمرات · ويضـــمن تعقيم الدقائق الصلبة في البيئة ، الرج والتحريك على شرط أن يكون ذلك خلال دورة التعقيم · ولذلك يجب ان تكون كافة اجزاء سائل التخمير والمعدات عند درجة حرارة التعقيم للمدة المعينة للمعاملة ، والا فقد تتكون بعض الجيـوب البـاردة **Cold Pocket** من السائل غير المعقم ، وهذه يمكن ملافاتهـا بالتصميم الجيــد والدقيق لمعــدات التخمير ·

فاذا كان هناك حوض تخمير يحتوي على 160 هكتولتر من البيئة فقـــد يحتاج الى 4 ساعات تقريبا ليكمل دورته التعقيمية عندما يستخدم بخار تحت ضغط 7 كغم/ سم^2 في ملفات التسخين · من هذه المدة ، يلزم 90 دقيقة لرفع درجة حرارة البيئة الى 120° م ، و30دقيقةعند درجة حرارة التعقيم ، و 120° دقيقة اضافية للسماح بتبريد البيئة بصورة جيدة قبل تلقيحها ·

ان التعقيم باستخدام بخار عالي الضغط يتطلب وجود مرجل بخاري (بويلر Boiler) يجهز بخارا عند ضغط 7 كغم/سم^2 ، وملفات تسخين مصـــممة للعمل تحت نفس الضغط ومخمر مشيد للعمل عنــد ضغط 1.05 كغم/ سم^2 · وينبغي ان يسمح التصميم بخروج الهواء التام من المعدات وذلك لتقليل الجيـوب الباردة التي تميل للتكوين في قاع المخمرات الطويلة ·

والضغط داخل المخمر هو مجموع الضغوط الجزئيــة لمحتـواه من البخـار والهواء · واي هواء يتواجد ســوف يسهم بالتـالي في الضغط الكلي ويقلل من الضغط الجزئي للبخار وينتج عنه الفشل في الوصول الى درجة حرارة التعقيم ·

وعندما يضغط البخار الحي Live steam الى داخل بيئة التخمر الباردة ، فان الحرارة تنتقل وقد يحدث تكثيف يؤدي الى تخفيف البيئة الى حد يصل الى 20%

وعلى عكس التعقيم بالبخار الحي تحت ضغط مرتفع ، فان التعقيم باستخدام المعقم البخاري للدوارق المحتوية على كميات قليلة من البيئة والمقفلة بسدادات قطنية يسبب تركيزا للبيئة بمقدار يصل الى 3-4 % ويحدث هذا التركيز بعد انتهاء التعقيم واثناء تبريد المعقم البخاري ، اذ ان تبريد البيئة يحدث بالدرجة الكبرى بواسطة تبخر الماء وقد يحدث غليان اذا فقدت البيئة الماء بسرعة كبيرة . ويستمر فقد الماء لغاية الوصول الى الضغط الجوي العادي . وعموما فان تركيز محتويات البيئة المعقمة يعتمد بالدرجة الرئيسة على الطريقة المتبعة في التعقيم ويجب عمل بعض الحسومات عند تغير نطاق العمليات الصناعية .

وهناك طريقة اخرى للتعقيم بدلا من استخدام المعقم البخاري او البخار الحي ، حيث يمكن تعقيم البيئات الغذائية الى درجة حرارة 80 — 100° م على فترات متعاقبة خلال ثلاثة ايام متتالية ويطلق على هذه الطريقة Tyndalization . وعادة تسخن البيئة الى درجة الغليان لمدة 30 دقيقة في اليوم الاول ولمدة 20 دقيقة في اليوم الثاني ولمدة 10 دقائق في اليوم الثالث . والفكرة في هذا الاجراء انه بعد هلاك الخلايا الخضرية بعملية الغلي في اليوم الاول فان ما يتبقى من سبورات تنبت على درجة حرارة 37 ٥م وتكون خلايا خضرية يمكن قتلها في اليوم الثاني، والسبورات القليلة التي تبقى بدون انبات بعد عملية الغلي في اليوم الثاني يمكن ان تنبت ، اذ يمكن القضاء على الخلايا الخضرية الناتجة منها بعملية الغلي في اليوم الثالث . وتتبع هذه الطريقة لتعقيم البيئات المحتوية على سكريات يخشى من تحليل باستعمال درجة حرارة المعقم البخاري او البخار الحي تحت ضغط مرتفع ، الا ان تقرير درجة تحلل السكريات عقب عملية التعقيم بالطريقتين السابقتين قد لا تبرر استعمال طريقة التعقيم المتقطع علاوة على ان الفترة بين عملية الغليان وحدوث الانبات تكون فترة قصيرة ومحدودة جدا ، الا ان عملية التسخين في حد ذاتها قد تشجع انبات السبورات .

وقد تكون عملية التعقيم المتقطع مفيدة في المناطق التي يكون فيها التعقيم بواسطة بخار تحت ضغط مرتفع غير ممكنة بسبب النقص في المعدات .

ويمكن استخدام الحرارة الجافة (الهواء الساخن) Dry Heat في اعمـــال التعقيم وبمقارنة الحرارة الرطبة بالحرارة الجافة في قتل الاحياء المجهرية نجد ان السبورات وخاصة البكتيرية منها والتي تعد من أكثر الاطوار البكتيرية مقاومـة للحرارة ، تهلك على درجات منخفضة من الحرارة خلال فترات قصيرة من الزمـن اذا استخدمت الحرارة الرطبة عما لو استخدمت الحرارة الجافة ٠ ففي حين تقضـي الحرارة الرطبة على الخلايا نتيجة لتخثر Coagulation البروتين الخلوي ، نجد ان الحرارة الجافة تقتل الخلايا عن طريق التجفيف Dehydration ، كما انـه من المعروف ان الحرارة الجافة تقضي على الاحياء المجهرية نتيجة لاكسدة محتوياتها ٠ وتستخدم طرق الحرارة الجافة في التعقيم عندما لايراد وصول البخار المضغوط الى المواد المراد تعقيمها ، ومن امثلة ذلك بعض المواد والاجهزة الزجاجية والتوصيلات الخاصة بالمخمرات وبعض الزيوت والمساحيق والمـــواد المماثلة كما تستخدم الحرارة الجافة في تعقيم الهواء حيث تستخدم درجة حرارة 330 ° م لعدة ثوان ٠ وفي مثل هذه الحالات من الضروري استخدام مسجلات حرارية دقيقة وكذلك اجهزة تحكم دقيقـة للحفاظ على درجة الحرارة بين 5 ــ 10° م أعلى من الدرجـة الحـرارية المحسوبة لعملية التعقيم ٠

2 ٠ الترشيح Filtration

هناك نوعان من الترشيح يستعملان في تعقيم السوائل والغازات وكل منهما يستخدم أساسا مختلفا ٠ والترشيح الحقيقي يتم بمرور السائل أو الهواء خـلال غشاء ذي حجم مسامي فعال اصغر من الاحياء المراد ازالتها ، وتتضمن هذه المرشحات شموع خزفية غير صقيلة او ملساء وزجاجا متلبدا sintered glass والطريقة الثانية لاتعتمد على حجم المسامات المتناهية الصغر ولكن على الفرصة العشوائيـة لارتطام الكائن الحي ومن ثم الالتصاق على الليف الصلب ، ومثل هذه المرشحـات تحتوي على مواد ليفية مضغوطـة (مثـل slag-wool ، والصـوف القطنـي cotton-wool أو الصوف الزجاجي glass-wool) وهذه مستخدمة بالدرجة الرئيسة في تعقيم الهواء ٠

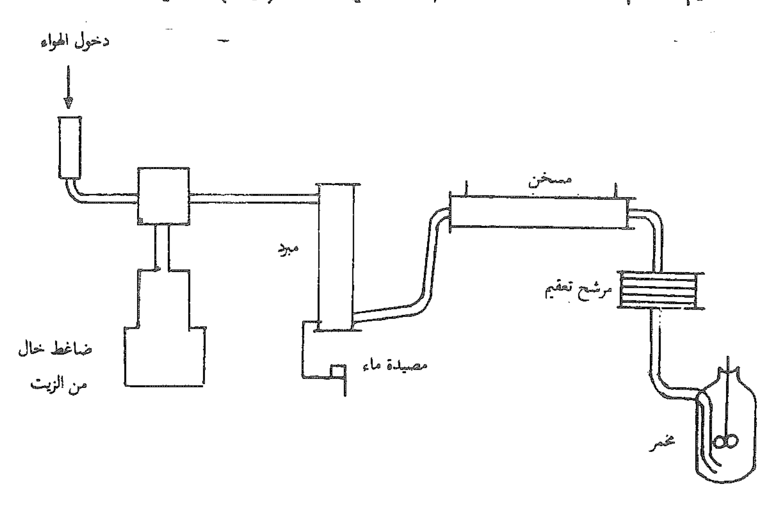
وينبغي تأمين ازالة الرطوبة أو الزيت قبل الترشيح اذ ان الالياف تميـل لان

تصبح مشبعة وبالتالي فان الرطوبة ستسمح للكائنات الحية أن تنتشر خلال المرشح ٠
وهناك ثلاثة أسباب معروفة لتلوث السائل في المرشحات الهوائية هي :ـ

1 . التصميم غير الصحيح لنظام الهواء المضغوط ٠
2 . الانخفاض الزائد في الضغط المصحوب بانخفاض درجة الحرارة في خط الهواء المجهز للمرشح ٠
3. التصميم الهزيل أو المحافظة غير الصحيحة لضاغط الهواء ٠

ان المشكلة الاساسية في تصميم مرشحات الهواء المضغوط تظهر عندما يضغط تحاوريا هواء رطوبته النسبية 50 % عند درجة حرارة 7.2 م (45° ف) إلى ضغط 14 كغم / سم^2 وينتج عنه تكثيف للماء ٠

وهناك حلان ممكنان : يمكن أن يعمل الضغط ادياباتيا (أي بدون فقد الحرارة) معطيا ارتفاعا لاحقا في درجة حرارة الهواء المضغوط ، أو أن الاخير قد يبرد لازالة الماء قبل تسخينه ثانية الى درجة حرارة تزيد على درجة نداوته ٠
والتصميم الملائم للامداد بالهواء المعقم مبين في الشكل (1.9) التالي :



الشكل (1.9) . تصميم نظام الهواء المضغوط لتجهيز هواء معقم

3.2 . الاشــعاع Radiation

من المعروف أن الاشعة الالكترومغناطيسية مثل الاشعة فوق البنفسجية في مدى طــول موجي 240—280 نانوميتر والاشعة الســينية **X-rays** واشــعة جاما gamma radiation **تحدث تأثيرا مميتا للاحياء المجهرية ·**

ان امتصاص الطاقة الاشعاعية بواسطة الخــلايا ينتــج عنه أما تأثيــر مميت للخلايا طبقا لنظام لوغاريتمي أو الى حدوث طفرات في الخلايا التي قد تنجو من التأثير المميت وهناك احتمالان لما يمكن ان يحدث للخلايا :

الاول : ان الاشعاعات تحدث تأثيرا مباشرا direct hit لمناطق حساسة من الخلايا تعرف بالهدف الحساس sensitive target وان الطاقة الاشعاعية تمتص في هذه المناطق وبالتالي يتغير تركيبها الجــزيئي ، وتعتبر المحتــويات النووية لهــذه المناطق اكثرها تأثيرا ، اذا ما علمنا ان المحتويات النووية ذات قدرة عالية لامتصاص الاشعة فوق البنفسجية ·

الثاني : ان الاشعاعات تحدث تأينا لما تحتويه الخلايا من الماء ومن جزيئات الاوكسجين التي تتواجد في منطقة مرور الاشعة في الخلية وان ما ينتج من ايونات يتفاعــل مع مكونات الخلية كما يلي :ـ

$$H_2O \longrightarrow [H^+] + [OH^-]$$
$$O_2 \longrightarrow 2\ [O^+]$$
$$[OH^-] + [O^+] \longrightarrow HO_2$$
$$[HO_2] + [H^+] \longrightarrow H_2O_2$$

والتفســير الاكثــر قبــولا هــو أن وجــــود ايــونات الهيدروبيروكسيل Hydroperoxyl [HO_2] والهيدروكسيل[OH^-]الحـرة بالخلايا عقــب تعــريضها للاشعاع هو الذي يحدث التأثير السام والمميت للخلايا عن طريق اكسدتها لجزيئات السايتوبلازم والاجسام النووية بالخلية ·

ومن الناحية الفسيولوجية لخــلايا الاحياء المجهــرية يمكن تحــديد منطقتين حساستين لفعل الاشعاعات :

الاول ـ هي الانزيمات الموجودة في السايتوبلازم الخلوي والمسؤولة عن التفاعلات الايضية المختلفة ·

الثانية ـ هي الاجسام النووية التي تتحكم في تكوين السايتوبلازم بانزيماته المختلفة ، وتحدد انتقال القدرات الانزيمية الى الاجيال المتعاقبة ٠

وفيما يختص بالمنطقة الاولى فيوجد من الادلة ما يثبت قدرة الاشعاعات على تثبيط الانزيمات الميكروبية المعزولة من الخلايا وأن عملية التثبيط تحدث نتيجة لاكسدة البروتينات الانزيمية وبخاصة اكسدة محتوياتها من مجاميع السلفاهيدريل sulfhydryl groups(SH =)الى مجاميع ثنائي الكبريتيد disulfide(-S-S-) وفيما يختص بالمنطقة الثانية فان مايحدث فيها من تغيرات نتيجة الاشعاعات يشمل الطريقتين التأثير المباشر والتفاعلات التاكسدية كما في حالة الانزيمات السايتوبلازمية ٠

ويستفاد عمليا من تأثير الاشعاعات الضارة بالاحياء المجهرية في تعقيم الاماكن كالمستشفيات وغرف العمليات الجراحية وغرف تعبئة الادوية والعقاقير في اوعية معقمة وفي غرف تحضير المزارع النقية ولتطهير السطوح الملوثة وبعض المعدات والبيئات المستخدمة في التخمرات الصناعية ٠

ويتناسب التأثير المميت للاشعاع مع كمية الجرعة الاشعاعية ولكن قدرة الاشعاع على النفاذ خلال الهدف تتناسب عكسيا مع كثافة الوسط ، وبالتالي فان كفاءة التعقيم تقل بسرعة كلما زاد الممر الذي ينفذ خلاله الاشعاع ٠

ولايعتبر استعمال الاشعة السينية X-rays (اشعة رونتجين Roentgen rays لاغراض التعقيم من الامور العملية للاسباب التالية : ـ

(1) ان انتاجها بالكميات الكبيرة اللازمة يعد من الامور الباهظة التكاليف ٠

(2) انه من الصعب استعمالها بالكفاءة اللازمة حيث ان اشعاعها تنتشر في جميع الاتجاهات المحيطة بمصدرها ٠

الا انه لايمكن استخدامها في انتاج طفرات من الاحياء المجهرية المختلفة لاغراض الدراسة ٠ اما اشعة جاما فيمكن الحصول عليها من اشعاعات النظائر المشعة Radioactives isotopes مثل الكوبلت 60 وهي تشبه الاشعة السينية في تأثيرها المميت للاحياء المجهرية الا أنها ذات موجات أقصر طولا ، ونظرا لقدرتها

العالية على اختراق الاشياء يبدو ان استعمالها قد يكون كثير الفائدة للتعقيم الداخلي للاشياء السميكة ٠

ويمكن أيضا استعمال الاشعاعات الالكترونية Electron Beam Radiation والتي تعرف باسم أشعة المهبط Cathode Rays في أغراض التعقيم لما لها من فعل مبيد للاحياء المجهرية عندما تكون ذات كثافة مرتفعة ٠

3 . الطرق الكيمياوية للتعقيم Chemical Methods of Sterilization

استخدمت مواد كيمياوية عديدة في ابادة وتعقيم الاحياء المجهرية الملوثة للبيئات الغذائية أو لمعدات التخمير ٠ ان درجة تأثر خلايا الاحياء المجهرية بالمادة الكيميوية السامة تتوقف على عدة عوامل أساسية منها : درجة تركيز المادة الكيمياوية ، ونوع الاحياء المجهرية وتعدادها ، وطول فترة تعرض الاحياء المجهرية للمادة الكيمياوية ٠ وهناك عوامل ثانوية يمكنها أيضا ان تؤثر في درجة مقاومة الخلايا للفعل السام للمواد الكيمياوية أهمها : رقم ال pH ودرجة الحرارة ووجود المواد العضوية في البيئة ٠

نحن نعرف ان الخلية الحية هي تلك القادرة على التكاثر ، والخلية الميكروبية التي يمكنها ان تنجو من التأثير السام للمادة الكيمياوية هي اذن تلك التي تكون قادرة على التكاثر في وجود المادة ٠ وأحياء لا تتكاثر الخلايا في وجود المادة الكيمياوية ولكنها قد تواصل نموها وانقسامها اذا ما أبعدت عنها ٠ والمواد الكيمياوية التي تمنع نمو وتكاثر البكتريا مثلا وخاصة عندما تكون ملاصقة لها تعرف باسم المواد الموقفة للنمو Bacteriostatic ، أما المواد الكيمياوية التي يمكنها احداث تأثير ضار ودائم للخلايا البكتيرية بمعنى انها توقف انقسام الخلايا بصفة دائمة تعرف باسم المواد المبيدة للبكتريا Bactericide والمواد المبيدة للفطريات يطلق عليها Fungicide ٠

ان التأثير المبيد والموقف للنمو بصفة مؤقتة يعتمد كثيرا على تركيز المادة الكيمياوية ، بمعنى ان مادة واحدة قد يكون تأثيرها موقفا فقط عندما تكون بتركيزات منخفضة في حين انها تحدث تأثيرا مبيدا لنفس الكائن الحي المجهري عندما يزيد تركيزها عن حد معين ٠ اذن لكل مادة كيمياوية نطاق من التراكيز يتراوح

بين التركيز غير الضار (عندما تكون على تراكيز منخفضة جدا) والتركيز المبيد او المميت ويقع بينهما التركيز الموقف للنمو ٠

ومن المعروف أن النشاط الخلوي يعتمد اعتمادا كليا على التفاعلات الحيوية المرتبطة التي تتم عن طريق الانزيمات الخلوية ، فاذا توقف أحد هذه التفاعلات يتوقف النمو ٠ والمادة الكيمياوية قد تكون على درجة عالية من التخصص بحيث يمكنها ايقاف خطوة واحدة من خطوات أحد التفاعلات الحيوية بالخلية أو أن تكون أقل تخصصا عندما تتمكن من احباط عديد من التفاعلات في وقت واحد ٠ وتقدر كفاءة المادة السامة بصفاتها الكيمياوية ، وبقدرتها على التفاعل مع المجاميع الفعالة للمكونات البروتوبلازمية ٠ ومن المواد الكيمياوية المستخدمة في التعقيم الاتي :—

1.3 . الاحماض Acids :—

تستخدم الاحماض في خفض رقم pH البيئة وبالتالي تهيئة ظروف غير مناسبة لنمو الكائنات الحية الملوثة للبيئة في حين تكون مناسبة لنمو كائن التخمر المجهري ٠ وخفض pH البيئة يستخدم في أحيان كثيرة كوسيلة لتقليص درجة الحرارة والمدة الزمنية للمعاملة الحرارية في بعض التخمرات وهذا يقلل من تكاليف البخـــــار المستخدم في التعقيم وبالتالي من تكاليف التخمر ٠

ومن الاحماض المستخدمة حامض الكبريتيك وحامض الهيدروكلوريك وحامض الكبريتوز وبعض الاحماض العضوية كالستريك والفيوماريك وغيرها ٠

2.3 . القلويات Alkali :—

وهذه تستخدم في تعديـل pH البيئـة الى الرقم المناسب للتخمر وأيضا في تنظيف الاجهزة والمعـدات المستخدمة ٠ ويعـد هيدروكسيد الصوديوم وهيدروكسيد البوتاسيوم من أكثر القلويات المستخدمة في هذا المجال ٠

3.3 . الكحولات Alcohols :—

لا يمكن الاعتماد على الكحـول الاثيلي في عمليـات التعقيم اذ ان تراكيزه المؤثرة في الخلايا الخضرية لا تؤثر في السبورات ، كما ان الكحول المثيلي يعـد أقل كفاءة من الكحول الاثيلي في قدرته التعقيمية ، الا ان كلا من كحول البروبيلي

والبيوتيلي يعدان أقوى كثيرا في قدرتهما التعقيمية من كحول الاثيلي · وتؤدي الكحولات فعلها السام نتيجة لتلف البروتين الخلوي **coagulation** وكذلك لتأثيرها التجفيفي للخلايا **dehydrating effect** . ·

4.3 . الفينول ومركباته :ـ

ويستخدم للتعقيم الخارجي لانه سام للانسان مثل الاجهزة والارضيات · ويكون اكثر تأثيرا في الخلايا الخضرية بينما تقاوم السبورات البكتيرية والفيروسات تأثيره بدرجة ملحوظة · ويتم الفعل السام على الخلايا الخضرية عن طريق تغيير طبيعة (دنترة) **denaturation** البروتين الخلوي وخاصة الغشاء السايتوبلازمي ·

5.3 . اليود :ـ

ويستخدم المحلول المائي أو الكحول مع يوديد البوتاسيوم في العلاجات السطحية وله تأثير مبيد غير متخصص على العديد من الاحياء المجهرية · ويؤدي اليود فعله السام باتحاده وارتباطه غير التخصصي بالبروتين الخلوي ·

6.3 . الكلور ومركباته :ـ

الكلور الغازي أو مركبات الكلور التي ينطلق منها الكلور في صور غاز يعتبر من أهم المطهرات الكيمياوية ، ويستعمل الكلور المضغوط في تعقيم المياه المختلفة والانابيب والتوصيلات لبعض أجهزة التخمر · ويرجع فعله المبيد أو المميت للاحياء المجهرية الى تفاعله السريع حتى ولو كان بتخفيف عال مع المركبات العضوية · وهناك مركبات من الكلور يمكن استخدامها بطرق اكثر سهولة من الكلور الغازي نفسه مثل الهيبوكلوريتات **Hypochlorites** كهيبوكلوريت الكالسيوم والكلورأمينات **Chloramines** كمونوكلورأمين ·

7.3 . المعادن الثقيلة ومركباتها :ـ

معظم المعادن الثقيلة أو مركباتها تكون ذات تأثير سام في الاحياء المجهرية ، وأكثر هذه المعادن تأثيرا في هذا المجال الزئبق ، والفضة والنحاس · ويرجع فعل المعادن في ايقاف النمو الى ارتباط هذه الايونات بالبروتينات الخلوية ·

وتستخدم المعادن في أغراض التعقيم والتطهير المختلفة منها معاملة مصادر المياه ٠ ومن مركبات المعادن الثقيلة المستخدمة في التعقيم والتطهير هي مركبات الزئبق غير العضوية مثل كلوريد الزئبقيك وكلوريد الزئبقوز وهناك مطهرات زئبقية عضوية مثل ميركيروكروم mercurochrome ومن مركبات الفضة نترات ولاكتات الفضة وبيكرات الفضة silver picrate ومن مركبات النحاس كبريتات النحاس ٠

واملاح المعادن الثقيلة قد تعمل على قتل الخلايا الميكروبية نتيجة لارتباطها مع البروتين الخلوي علاوة على قدرتها الترسيبية اذا تواجدت في تركيزات مرتفعة نسبيا ٠

8.3 . الصابون والمركبات الخافضة للتوتر السطحي :-

يطلق اسم المنظفات Detergents عادة على المواد التي تقلل من التوتر السطحي للسوائل او المواد المبللة التي منها الصابون بمختلف انواعه ، وهذه تعد مطهرات متوسطة القوة وذات قدرة اختيارية في التأثير في الاحياء المجهرية ٠ والاهمية القصوى في استعمال الصابون تتمثل في الازالة الميكانيكية للاحياء المجهرية عن السطوح التي تغسل بها مثل الايدي والادوات والمعدات والاجهزة وغيرها ، كما وانها تقلل من التوتر السطحي للماء وتجعله أقدر على التغلغل في الاشياء المغسولة علاوة على قدرة الصابون على استحلاب وازالة الزيوت الملوثة الاخرى ٠

9.3 . الفورمالدهيد Formaldehyde

الفورمالدهيد عبارة عن غاز يكون ثابتا فقط عندما يتواجد في تركيزات مرتفعة او في درجات الحرارة المرتفعة ٠

واهم صورة لهذا الغاز هي البارافورمالدهيد Paraformaldehyde وهي مادة صلبة عديمة اللون ينطلق منها غاز الفورمالدهيد عندما تسخن ٠ وغاز الفورمالدهيد يمكن الحصول عليه في صورة محلول مائي يعرف باسم فورمالين والذي يحتوي على 37 — 40 % فورمالدهيد ٠

يعد الفورمالين والبارافورمالدهيد المصدرين الرئيسين لغاز الفورمالدهيد

اللازم لتعقيم الغرف والابنية في الاغراض التعقيمية أو التطهيرية المختلفة · فاذا رفعت درجة حرارة اي من المركبين في مكان مغلق لفترة كافية ينطلق غاز الفورماهيد الـــذي يطـــهر هذا المكان ·

وغاز الفورمالدهيد يؤثر في الخلايا بدرجة اكبر من السبورات ·

10.3 . المضادات الحيوية Antibiotics :

المضادات الحيوية عبارة عن مواد كيمياوية عضوية تنتج عن التفاعلات الايضية لبعض الاحياء المجهرية التي تكون مبيدة او موقفة لنمو ونشاط غيرها من الكائنات الحية المجهرية ·

وقد استخدمت المضادات الحيوية ولاتزال في علاج كثير من الحالات المرضية التي تصيب الانسان والحيوان والنبات علاوة على استخدامها كوسيلة من وسائـــل التعقيم أو التطهير للبيئات المستخدمة في التخمرات الصناعية ·

4 . اختبار العقم Sterility Testing

اختبارات العقم على عينة صغيرة من البيئة قد تظهر ان الكمية الكلية ليست ملوثة ، وعلى الرغم من فائدة هذه الاختبارات الا انها لاتستطيع اثبات عقم البيئة · وعلى سبيل المثال ، قد يكتشف تلوث في اختبار عقم على عينة قدرها 500 مل مأخوذة من بيئة معقمة حجمها الكلي 200 هكتولتر ، فهذا يعني ان المحلول يجب ان يحتـــوي في الاقل على كائن حي مجهري واحد اذا كان ملوثا · وفي الحقيقة ، قد يكون التلوث اكبر من ذلك بكثير ، اذ تحتاج البيئة الكلية ان تحتوي في الاقل على 40,000 كائن حي مجهري موزعة بانتظام وذلك لضمان الكشف عن التلوث في عينة قدرها 500 مل · وبصورة مماثلة ، فان تفسير اختبارات العقم تعتمد على الطريقة المستخدمة ، وهذه بدورها يجب أن تستنبط او تبتكر لدعم نمو الملوثات المتوقعة في تخمر معين · وعلى سبيل المثال ، ينبغي ان تصمم اختبارات العقم في التخمرات الهوائية الشديدة لكشف عن الملوثات الهوائية وليس اللاهوائية ·

ان الكائنات الحية الصناعية البطيئة النمو (مثل الاكيتنومايستيات والفطريات) وخصوصا عندما تتلوث او التي في مراحل نموها المبكرة من المتوقع ان تعاني كثيرا من وجـــود الملوثات · ومن اكثـــر الكائنات الحيـــة الاعتيادية الملـــوثة في بيئـــات

الاكتينومايسيتس المنتج للستربتومايسين وفي بيئات الفطر المنتج للبنسلين هي البكتريا السريعة النمو المكونة للسبورات مثل **Bacillus subtilis** . ويمكن كشف هذا الكائن الحي بتخطيط مقدار بسيط من البيئة السائلة على سطح آجار معقمة (مستخلص لحم 0.3 % ، ببتون 0.5% ، آجار 1.5 % و pH 6.8) وحضنها على 37 م لمدة 3 أيام أو بتلقيح 10 مل من بيئة سائلة معقمة (مستخلص خميرة 0.5 % ، ببتون 1 % Na_2HPO_4 0.75% ، جلوكوز 1% و Lab Lemco 0.5 % , pH 7.0) بواسطة مليلتر واحد من سائل التخمير المشكوك بتلوثه قبل التحضين بنفس الطريقة ٠

5 . الطهارة Asepsis

ان اساس الطهارة يستخدم تغيرا مباشرا لظروف بيئية غير مؤاتية لمنع اوتأخير نمو الكائنات الحية الملوثة ، بدلا من قتلها كما في التعقيم ٠ وهناك درجات من التطهير في جميع مظاهر الحياة ، وسنتناول أهمها بايجاز :ـ

1.5 . النظافة Cleanliness

ان المواد الملائمة لنمو الاحياء المجهرية غير المرغوبة كما هو الحال مع منتجات الالبان قد تستبعد في بعض الاحيان بالنظافة ٠ فالحليب قد يدعم نمو عدد من الاحياء المجهرية الملوثة ٠ وبالتالي فان خطوط انابيب منتجات الالبان تكون مصممة للسماح بالتنظيف التام ، ومبنية من مواد ذات سطح صقيل جدا وخالية من التشققات والتصدمات ٠

والصحة الشخصية هي اتجاه اخر مهم للنظافة ، وخصوصا في مصانع الاغذية وفي الاماكن المعقمة حيث يكون العاملون المصدر الرئيس للتلوث ٠ وهناك عدد من القواعد العامة التي تحكم النظافة الشخصية كوسائل تخدم في التطهير :

1 . الاحتياط في نظافة الملابس من الرأس الى القدم ويفضل ارتداء جزم طويلة الساق Wellington boots واردية سروالية فضفاضة Overall وغطاء للشعر ٠

(2) فحص طبي روتيني لضمان الخلو من الاصابات المعدية او الناقلة للعدوى ٠

(3) الاحتياط في غسل المعدات وتنفيذ قوانين استخداماتها ٠

2.5 . درجة حرارة منتظمة Controlled Temperature

يمكن خفض معدل نمو الاحياء المجهرية الى حد كبير بالتبريد الى 5° م · وان نمو اغلب الاحياء يكون مهملا عند حوالي صفر مئوي الا انه من المحتمل ان تبقى بعض انزيماتها نشطة حتى تصل درجة الحرارة الى 80° م · وتفشل درجة الحرارة المنخفضة لوحدها في قتل انواع عديدة من الاحياء المجهرية ، وعادة تبقى السبورات قابلة للحياة او النمو حتى بعد التبريد الى ــ 80° م · فالتبريد (عند 5° م) او التجميد (عند-20° م) قد يكون بالتالي منطويا على المخاطرة اذا سمح لدرجة حرارة الناتج ان ترتفع مؤقتا خلال التخزين ، بحيث أن الكائنات الحية الطبيعية تتكاثر ولكنها تبقى غير مكتشفة ·

3.5 . الرطوبة المنظمة Controlled Humidity

يعـد الماء أو بخار الماء أساسيا في استمرار نمو الاحياء المجهرية · فالتحكم بالرطوبة لمنع التكثيف يستخدم خلال التخزين الصناعي للفواكه ، ولذلك يجب ان يكون دوران الهواء دقيقا ولكن ليس مفرطا مما يؤدي الى تجفيف الناتج ويجب أن تبقى درجة الحرارة منتظمة ·

الفصــل العاشــر

التخمرات المزدوجة أو المتعددة

Daul or Multiple Fermentations

التخمرات المزدوجة أو المتعددة هي تلك التخمرات التي يستخدم فيها اكثر من كائن حي مجهري واحد ٠ اذ تلقح الكائنات الحية في وقت واحد في بيئة النمو ، أو أن كائنا حيا واحدا قد ينمي اولا في البيئة ، يليه تلقيح ونمو الكائن الحي المجهري الثاني ٠ أو كبديل عن ذلك انه بعد حدوث النمو في البيئات الاصلية ، يمكن الجمع بين تخمرين منفصلين معا لاكمال النشاط الاضافي ٠

والفكرة الاساسية في هذه التخمرات هي ان اثنين او اكثر من الكائنات الحية المجهرية ينجزان شيئا ما لا يمكن ان ينجزه كائن حي مجهري بمفرده ٠

وهناك استخدامات عديدة ومهمة للتخمرات المزدوجة أو المتعددة منها :ـ

1 . استخدام كائن حي مجهري واحد لانتاج ناتج التخمر الذي يتحول بعد ذلك او يتغير بواسطة كائن حي مجهري آخر أو عدة احياء مجهرية الى نواتج تخمرية مختلفة لها قيمة اقتصادية اكبر ٠ ومثال على ذلك ، انتاج الخل ، اذ تنتج الخميرة الكحول الاثيلي اولا ومن ثم تقوم انواع بكتريا **Acetobacter** بتحويل الكحول الى خل ٠

2 . استخدام كائن حي مجهري واحد لتغيير او تهيئة البيئة لتصبح اكثر ملاءمة لنمو كائن حي مجهري آخر ٠ وعلى سبيل المثال ، قد يجهز الكائن الحي المجهري نشاطا لانزيم الاميليز أو البروتيز من أجل الكائن الحي المجهري الثاني الذي يفتقر الى هذه النشاطات ٠

3 . استخدام كائن حي مجهري ما لازالة النواتج الثانوية الايضية السامة لكائن حي مجهري آخر ، أو كائن حي مجهري لتجهيز عوامل نمو لكائن آخر ، أو كائن حي مجهري لازالة الاوكسجين أو لخفض جهد الاكسدة والاختزال لكائن حي مجهري لا هوائي ، أو كائن حي مجهري ليبقي مدى الـ pH حرجا لكائن آخر ٠

4 . استخدام كائن حي مجهري لاعطاء ناتج أيضي مثل حامض اللاكتيك ، الذي يكون مفيدا لنمو الكائن الحي المجهري الثاني كالخميرة ، وبنفس الوقت يساعد في السيطرة على التلوث ٠

ان نمو اثنين من الكائنات الحية المجهرية التخمرية في وقت واحد وفي بيئة واحدة يعرض مشكلة في البيئة العامة الميكروبية ٠ اذ ينبغي ان يكافح كل كائن حي

مع النشاطات الفسيولوجية والنمو والاستفادة من المواد المغذية للكائن الاخر ومن المحتمل ان تكون معدلات نموها مختلفة بحيث ان احد الكائنين يتفوق في نموه على الاخر • لذلك يقتضي الامر اجراء دراسات مستفيضة عن البيئات الغذائية وظروف التخمر الاخرى وذلك لموازنة نمو كائنين او اكثر • وتصبح هذه المشكلة بسيطة جدا أو كبيرة جدا اذا تواجدت صورة معينة من التعايش أو التكافل symboisis بين الكائنين ، بحيث يعتمد احدهما على الاخر نموها • ومثال التخمر المزدوج الجاري في وقت واحد الذي لايتضمن المعيشة التكافلية قد يكون ذلك الذي فيه كائن حي مجهري يستخدم الجلوكوز لانتاج حامض ∝-كيتوجلوتاريك في حين الكائن المجهري الثاني يستخدم الجلوكوز ايضا للنمو ولادخال مجموعة أمين الى حامض ∝ - كيتوجلوتاريك ليعطي حامض الجلوتاميك •

ومن جهة النظر التخمرية يسهل التحكم بالتخمرات المزدوجة او المتعددة التي فيها كائن حي واحد يتبعه تلقيح ونمو الكائن الحي الثاني • ويعد هذا صحيحا وخاصة اذا كان بالامكان قتل الكائن الحي الاول بالحرارة او بطريقة اخرى من طرق التعقيم قبل التلقيح بالكائن الحي الثاني •

ان الانجازات الاساسية لهذه الطريقة تكون مشابهة لتلك التخمرات المزدوجة ذات التلقيح الاتي • وكمثال على هذه الطريقة هو النمو الابتدائي للكائن الحي المنتج لنشاط محلل للبروتين أو النشا في البيئة لتهيئته لنمو لاحق لكائن حي لا يمتلك هذه النشاطات • وحاليا وجدت عملية جمع تخمرات منفصلة لاعطاء نشاط تخمري اضافي طريقها في التطبيق الصناعي وفي هذه الطريقة التخمرية ، فان تخمرا ما يعطي عادة ناتجا ينبغي ان يتغير انزيميا الى ناتج آخر ذي قيمة اقتصادية أكبر ، ويوفر التخمر الاخر الاحياء المجهرية المحتوية على الانزيمات الوثيقة الصلة في اجراء هذا التغير الذي تتوسطه الانزيمات • ومثال على ذلك هو التخمر المزدوج المستخدم في انتاج L — لايسين • اذ تنتج بكتريا **Escherichia coli** في أحد التخمرات حامض ∝ , € — diaminopimelic وفي تخمر آخر تنمو بكتريا **Aerobacter aerogenes** المحتوية على انزيم diaminopimelic acid decarboxylase ويتم جمع هذين التخمرين بحيث

يمكـــن لانزيـم diaminopimelic acid decarboxylase لبكتـــريا **Aerobacter aerogenes** أن يزيـل مجمـــوعة كربوكســـيل من حـامض diaminopimelic — $\in$, $\propto$ الناتج من تخمر بكتريا **Escherichia coli** لاعطاء L – لايسين · وكذلك يضاف التولوين عند وقت جمع التخمرين وذلك من أجـل أن يتحـــرر انزيـم diaminopimelic acid decarboxylase من خلايا بكتريا **Aerobacter aerogenes** بحيث تقتل خـلايا كـلا النـوعان ولا يقومان بعد ذلك بأي استفادة ايضية لمكونات البيئة او نواتج التخمر ·

ان التخمرات المزدوجة أو المتعددة كما سبق وصفها اعلاه تعرض امكانيات خادعة للاستخدام الصناعي للاحياء المجهرية · وعلى اية حال فان الحاجة لا تزال قائمة لمزيد من الدراسات في هذا المجال ، وخصوصا في تلك الحالات التي تنمـو فيها الإحياء المجهرية وبوقت واحد في نفس البيئة الغذائية · لذلك فان فهما أكبر للبيئة العامة الميكروبية قد يسهم على نحو كبير في الجهد الصناعي لمختلف هـذه التخمرات ·

الفصل الحادي عشر

التخمرات المتقطعة والمستمرة

Batch and Continuous Fermentations

1 . مقدمة

2 . الطرق المختلفة للتخمر المستمر

3 . التحكم بالتخمر المستمر

4 . الاعتبارات المهمة في التخمر المستمر

5 . اشهر انواع التخمرات المستمرة



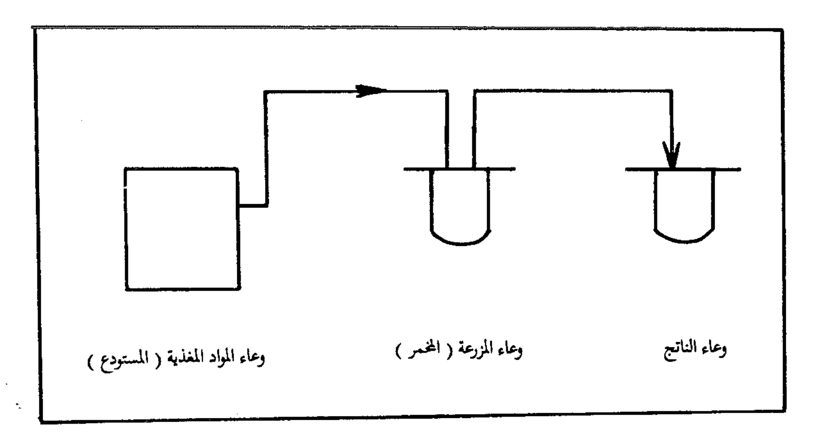
1 . مقدمة Introduction

ان نمو الكائن الحي المجهري خلال التخمر المتقطع أو تخمر الوجبة الواحدة batch fermentation يطابق صفات منحنى النمو السابق شرحه (الفصل الثاني) ٠ اذ يؤدي طور الركود lag phase أو فترة التطبع على البيئة الى الطور اللوغاريتمي ، الذي فيه ينقسم الكائن الحي أسيا ٠ وهذا بدوره ينتهي بتناقص متزايد في معدل النمو نتيجة للعجز في واحد أو اكثر من المواد الغذائية الاساسية لغاية الوصول الى طور النمو الثابت عندما تبقى كمية البروتوبلازم في المزرعة ثابتة ٠

ومن الواضح ، ان الوقت المبذول في طور الركود والطور الثابت يعد ضائعا عند انتاج خلايا ميكروبية ، ولهذا السبب تحولت صناعة الخميرة التجارية وصناعة البيرة تدريجيا الى طرائق حديثة متطورة من التخمر المستمر ٠

فالتخمرات المستمرة هي تلك التخمرات التي تضاف فيها بيئة مغذية جديدة اما باستمرار او بصورة متقطعة الى حوض التخمير ، ويصاحب ذلك سحب مماثل بصورة مستمرة أو متقطعة لجزء من البيئة من أجل استرجاع الخلايا أو نواتج التخمر ٠ وهذا على خلاف عملية ٠ التخمر المتقطعة او ذات الوجبة الواحدة والتي يلقح فيها حجم كبير من البيئة الغذائية ثم يسمح لحدوث النمو والتخليق الكيموحيوي لغاية الحصول على اعلى كمية ممكنة من الناتج ٠ وعند هذه النقطة ، يتم ايقاف التخمر المتقطع من اجل استرجاع الناتج وينظف المخمر ويعاد تعقيمه ومن ثم يتم البدء بتخمر جديد ٠ ومن اللمحة الاولى ، يبدو ان التخمر المستمر هو افضل الطريقتين وذلك بسبب الاستخدام الثابت لمعدات التخمر مع زمن توقف قليل ٠ ومن الناحية النظرية في الاقل فان الانتاج الاضافي للقاح بعد التلقيح الاولي يعد غير ضروري ٠ ورغم ذلك سنرى ان المشاكل المتأصلة والمرتبطة بعملية التخمر المستمر لاتسمح في الغالب باتجاه هذا الهدف ٠

والشكل (1.11) يوضح رسما تخطيطيا لابسط جهاز يستخدم للتخمر المستمر للاحياء المجهرية ٠



الشكل (1.11) رسم تخطيطي لتخمر مستمر

اذ ينمى الكائن الحي المجهري في وعاء المزرعة تحت الظروف البيئية المرغوبة ، ويتم امداده بالبيئة الغذائية الجديدة باستمرار وبمعدل ثابت • وهذا يسمح بمستوى ثابت من سريان سائل التخمرات يتدفق الى وعاء الناتج وبمعدل مساو لمعدل دخول البيئة الى وعاء التخمر •

2 الطرق المختلفة للتخمر المستمر
Various Methods of Continuous Fermentation

يمكن اجراء التخمر المستمر بعدة طرق مختلفة • اذ يمكن اجراؤه بطريقة المرحلة الواحدة single stage , التي فيها يلقح مخمر واحد ومن ثم يشغل بصورة مستمرة عن طريق موازنة دخول المحلول المغذي وخروج المزرعة التي تم حصادها •

والطريقة الثانية هي التخمر المستمر الدوراني recycle continuous fermenttation حيث يسحب جزءا من المزرعة او بقايا المواد المغذية غير المستعملة زائدا المزرعة المسحوبة وتعاد اضافتها الى وعاء التخمر • فمثلا في تخمر الهيدروكربون فان مادة التفاعل الهيدروكربونية غير الممتزجة تضاف ثانية من اجل ان تهاجمها الاحياء المجهرية من جديد • وكذلك فان جزء من الاحياء الناتجة خلال التخمر المستمر يمكن اضافته ثانية في الحالات التي

يكون فيها مستوى مادة التفاعل المتيسرة الفعلية ، في المحلول المغذي الخاص بنمو الاحياء المجهرية منخفضا تماما • ومثال على هذا النوع من مواد التفاعل هو المحلول الكبريتي المتخلف بمحتواه المنخفض من الكربوهيدرات المتاحة ، وفي هذه الحالة تؤدي اضافة الخلايا ثانية الى تجهيز مجموع خلوي عال في المخمر وبالتالي الحصول على انتاجية أعلى •

والطريقة الثالثة هي التخمر المستمر المتعدد المراحل multi-stage وهذه تتضمن مرحلتين او اكثر مع تشغيل المخمر بالتتابع • ولاتمام هذه الطريقة يقسم التخمر الى عدة اطوار او اوجه بحيث ان طور النمو يحدث في مخمر المرحلة الاولى ، يتبعه مرحلة تخليقية في المخمر الثاني والمخمرات اللاحقة • ويكون التخمر المستمر المتعدد المراحل قابلا للتطبيق خصوصا في التخمرات التي يكون فيها النمو والنشاطات التخلقية للخلايا غير آنية ، أي أن التخليق لا يكون متعلقا بالنمو وانما يحدث بعد تناقص معدل تكاثر الخلايا •

3 . التحكم بالتخمر المستمر Control of Continuous Fermentation

هناك عدة وسائل يمكن بواسطتها التحكم بالنشاط الميكروبي في المزرعة المستمرة غير ان طريقتين فقط منها نالتا الاستحسان الكبير في التخمرات الصناعية هما Chemostat , turbidostat . وينبغي التنويه الى أن كل هذه الطرائق تكون سهلة التطبيق فقط في العمليات التخمرية ذات العلاقة بالنمو البسيط نسبيا في انتاج الخلايا الميكروبية كنواتج تخمر •

وفي حالة ل turbidostat يحافظ على المجموع الخلوي الكلي ثابتا وذلك باستخدام جهاز يقيس عكارة المزرعة لتنظيم معدل اضافة المواد المغذية الى المخمر ومعدل سحب المزرعة منه • واذا ارتفعت اعداد المجموع الى مستوى أعلى من المستوى المقدر سلفا فان كمية أكبر من بيئة جديدة تضاف الى المخمر لتخفيف تركيز الخلايا • وعليه لا توجد مادة مغذية محددة مفروضة بتعمد في هذه العملية ، أي ان معدل نمو الخلية ينبغي أن يكون دائما في أقصاه •

وعلى أية حال ، يجب ان يحافظ على النمو في طور النمور اللوغاريتمي او قريبا جدا منه • ويعد هذا العامل من المساوىء وذلك لوجوب تشغيل التخمر ،

باقل عدد من الخلايا مما هو ممكن في حالة الـ Chemostat ، وهذا يسبب في وجودة متبقيات كثيرة من المواد الغذائية غير المستخدمة حيث تفقد من التخمر عندما تسحب المزرعة المحصودة ·

في حين يحدث العكس في حالة الـ Chemostat ، اذ يحافظ الـ Chemostat على معدلي اضافة المواد المغذية وسحب المزرعة المحصودة عند قيم ثابتة ، الا أنها دائما اقل من تلك التي تسمح بأكبر معدل نمو · حيث يتحكم بمعدل النمو بواسطة تجهيز كمية محددة فقط من مواد النمو الغذائية الحرجة في المحلول الغذائي · وبالتالي فان تكاثر الخلايا لا يمكن أن يجري بمعدل اكبر من ذلك المسموح به بواسطة تيسر هذه المواد الغذائية الحرجة · وان عامل السيطرة او التحكم بالنمو قد لا يكون بالضرورة هو المادة المغذية المحدودة ، وانما قد يكون تركيزا عاليا نسبيا من ناتج سام للتخمر ، او قيمة الـ pH او حتى درجة الحرارة · ويستخدم مفهوم الـ Chemostat للتخمر المستمر بدرجة اكبر من الـ turbidostat وذلك بسبب قلة المشاكل الميكانيكية التي تواجهها وبسبب وجود مواد غذائية متبقية غير مستخدمة أقل في المزرعة المحصودة ·

وفي كلا الطريقتين من الضروري الحفاظ على مجموع خلوي ثابت في المخمر· وفي هذا المجال ، فان التغذية بمواد غذائية جديدة الى المخمر يكون حرجا ومهما لانه يكون ذا علاقة بوقت الجيل generation time للكائن الحي · وقد يسمح معدل سريان منخفض جدا للمزرعة ان تذهب الى اقصى الوجه الثابت من النمو بحيث لايمكن المحافظة على الاتجاه المستمر للتخمر · وعلى العكس فان معدل سريان عاليا جدا بالنسبة الى وقت الجيل يستطيع ان يخفف المجموع الخلوي في المخمر بازالة الخلايا عند افراغ المزرعة بصورة اسرع من قدرتها على الامتلاء ثانية بواسطة النمو ·

4 . الاعتبارات المهمة في التخمر المستمر

تشير العديد من الابحاث والدراسات الى ان انتاجية التخمر المستمر تكون كبر من التخمر المتقطع ذي الوجبة الواحدة · وبافتراض ان هذه الحالة صحيحة

اذن لماذا تحول عدد قليل من تخمرات الوجبة الواحدة بنجاح الى عملية تخمر مستمر ؟
بالتأكيد هناك عدة اجابات على ذلك : ــ

1 . ان عملية تخمر مستمر ناجحة تحتاج الى معرفة شاملة بالاتجاهات الديناميكية للسلوك الميكروبي والنمو ، ومعرفة بنواقص اغلب عمليات التخمر الصناعي بسبب تعقيدات النمو واساليب التخليق للاحياء المجهرية ·

2 . يعرض التلوث والتطفر عملية التخمر المستمر الى مشاكل عديدة ، اذ ان ان فترات التحضين الطويل المرتبطة بالتخمرات المستمر قد تسمح للملوثات المجهرية باكتساب سطوة او هيمنة في المزرعة · رغم ان لبعض التخمرات اجهزة سيطرة ذاتية ضد التلوث ، كوجود الكبريتيت عند pH منخفض في المحلول الكبريتيي المتخلف المستخدم في تنمية خميرة التوريلا · وقد اقترحت اضافة المضادات الحيوية او المواد الكيمياوية الى التخمرات المستمرة لكبح مستوى نمو الملوثات ·

ويصبح تطفر احياء التخمر مشكلة فقط اذا كانت للخلايا الطفرية الناتجة ميزة نمو انتخابية خلال فترة التحضين الطويلة . وبنفس الوقت تنتج كميات أقل من ناتج التخمر المرغوب· ولتجنب التطفر اقترح استخدام تخمرات مستمرة متعددة المراحل اذ تتم اعادة تلقيح المخمر الاول في سلسلة المخمرات دوريا · وعلى الرغم من ذلك فان الحل الحقيقي والاجمالي لمشكلتي التلوث والتطفر هو تقليص معدلات حدوثها بحيث ان الخلايا المؤذية يتم طردها من المخمر قبل أن تتاح لها الفرصة للتكاثر ·

3 . غالبا تقوم التخمرات المستمرة باضاعة للمواد المغذية · وذلك لاحتواء سائل التخمر الذي يسحب باستمرار من اجل استرجاع الناتج على كميات معينة من المواد المغذية غير المستخدمة المتبقية من البيئة بالاضافة الى جزء من المكونات الغذائية الجديدة المضافة باستمرار الى التخمر · وفي حالات قليلة ، من الممكن فصل المواد المغذية المتبقية من المزرعة المحصودة بحيث يمكن اعادتها الى المخمر ·

4 . تحتاج بعض بيئات التخمر الى استخدام مزج فعال في المخمر لتوزيع البيئة

الجديدة المضافة بالتساوي الى اجزاء السائل كافة الموجودة في المخمر · ان الحصول على مزج صحيح يعد مشكلة عندما تضاف المواد الغذائية الجديدة ببطؤ وبصرف النظر عن لزوجة البيئة ·

5. اصبحت التخمرات المستمرة اكثر تعقيدا او صعوبة في الانجاز عندما يكون الناتج مادة كيمياوية وليس خلية ميكروبية ، اذ غالبا ماتختلف الظروف المثلى لنمو الخلايا عن تلك المستخدمة لاعطاء الناتج الكيمياوي · وهذه الصورة أصبحت أكثر تعقيدا في حالة التخمر المتقطع ذا الوجبة الواحدة ، اذ أن تتابع تكوين النواتج الوسطية في الخلايا أو في البيئة يكون متبوعا باعادة استخدام هذه المركبات من قبل الخلايا اثناء النمو وتكوين الناتج ·

ومن الجلي ، اذا أجري تخمر مستمر من مرحلة واحدة لهذه التخمرات ، وجوب الوصول الى حلول للظروف التغذوية والفيزياوية المستخدمة في التخمر · ويبدو أن البديل هو التخمر المستمر المتعدد المراحل الذي يسمح بالنمو في المرحلة الاولى ولتكوين الناتج في المرحلة الثانية وما يليها من مراحل ·

ان طريقة أخرى مماثلة نوعا ما للتخمر المستمر لكنها لا تقع ضمنه وهي استخدام اضافات متأخرة للمواد المغذية الى التخمر المتقطع ذي الوجبة الواحدة · وبالتالي اذا كانت هناك مادة تفاعل سامة نوعا ما للكائن الحي المجهري ، فيمكن اضافتها في وقت تركيب البيئة وعلى مراحل خلال التخمر بحيث يتم الحفاظ على مستويات كلية منخفضة نسبيا ·

أيضا اذا كان الكائن الحي يستخدم ظاهرة diauxie phenomenon ، فيمكن اضافة مادة التفاعل الاولى في البداية ، وتضاف الثانية او مادة التفاعل البديلة خلال التخمر عند وقت تكون مادة التفاعل الاولى قد اختفت تقريبا ·

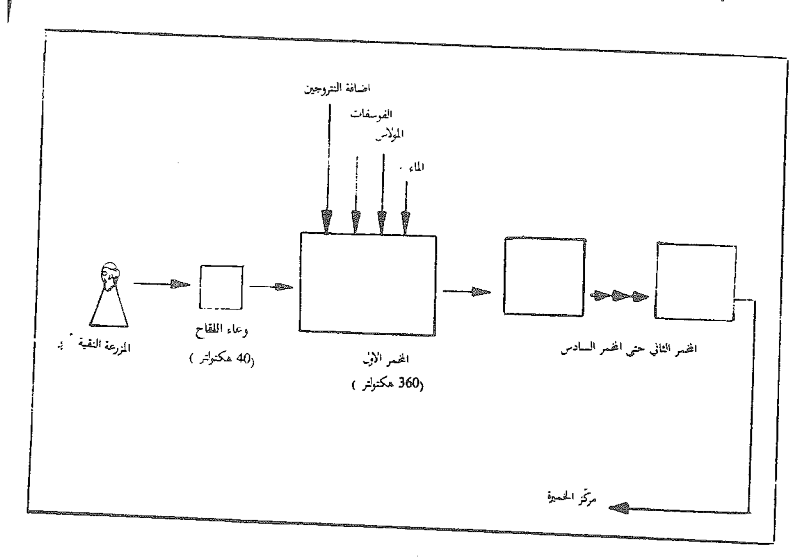
وكذلك تحدث الاضافة المتأخرة للمواد المغذية عندما تضاف الامونيا خلال التخمر لابطال او لمعادلة الانخفاض في قيم pH التخمر · وتقوم هذه الامونيا بتجهيز نتروجين اضافي للكائن الحي المجهري · وقد تسبب نتائج تخمرية متنوعة اذا وجب ان يكون مستوى النتروجين في البيئة هو العامل المسيطر في التخمر ·

5 . اشهر انواع التخمرات المستمرة

درس العديد من العمليات التخمرية في الاقل على نطاق معملي تجريبي لامكانية تحويلها الى عمليات تخمر مستمر ۰ ومن ضمن عمليات تخمر عديدة كتب النجاح لتحويل بعضها الى تخمرات مستمرة هي :

انتاج البيرة ، وانتاج الخمائر العلفية (من المحلول الكبريتيتي المتخلف) ، والخل وخميرة الخباز (من المولاس)، وانتاج بعض المضادات الحيوية مثل الكلورامفينكول والبنسلين ، والستربتومايسين ، وصناعة النبيذ ، وانتاج فيتامين B_{12} والانتاج المستمر لبروتين الطحالب ۰ وكذلك تستخدم هذه الطريقة في التخلص من المخلفات ۰

ويوضح الشكل (2.11) عملية مستمرة لانتاج خميرة الخباز في بيئة المولاس وهي متكونة من ستة مخمرات متصلة ببعضها بصورة متسلسلة بدلا من استخدام مخمر واحد كبير ۰



الشكل (2.11) رسم تخطيطي لتخمر مزرعة مستمرة من خميرة الخباز ۰

ولاتزال الدراسات جارية لتحويل تخمرات الوجبة الواحدة الى تخمرات مستمرة اقتصادا في حجم أوعية ومعدات التخمر وما يدخل في تماس مع العملية التخمرية وكذلك اقتصادا في التكاليف والعمالة بالاضافة الى الحصول على صفات منتظمة وموحدة للنتائج • ولكن يجب ان لايغرب عن البال ان من المشاكل التي تواجه التخمرات المستمرة ، انه اذا حدث خطأ او خلل او تلوث في احدى خطوات التخمر فان ذلك يؤدي الى ايقاف العمل بأكمله وهذا قد يؤدي الى خسارة اقتصادية كبيرة ، وبعكس تخمرات الوجبة الواحدة التي يتم فيها الاستغناء عن تلك المرحلة التي حدث فيها الخطأ واكمال التخمر بعد تحضير باديء جديد اذا لزم الامر •

الفصل الثاني عشر

كشف وتحليل نواتج التخمر

Detection and Assay of Fermentation Products

1 . مقدمة Introduction

تحتاج الفربلة الثانوية ـ والى حد ما الفربلة الاولية ـ الى طـرق جيـدة للكشف عن نواتج التخمر وتحليلها · ويعد هـذا صحيحا بالنسبة لمعظم دراسات التخمر وفي جميع مجالات تطويرها · وينبغي أن تكون هذه الطرق سريعة وبسيطة وموثوقة ودقيقة ، ويجب ان يقاس المركب المراد تقديره فقط في وجود تراكيز عالية نسبيا من المواد الكيمياوية المختلفة الموجودة في بيئة النمو · وغالبا ما تقع هـذه الطـرق التحليلية في احـدى الفئتين :ـ طـرق التحليـل الفيزيوكيمياوية Physiochemical Assays وطرق التحليل البيولوجية Biological Assays .
وفي بعض الاحيان قد تستخدم اكثر من طريقة في الكشف عن مكون معين وتقديره في بيئة النمو أو تتبعه خلال عملية التخمر ، وبالتالي فان اختيار طريقة التحليل تتوقف على سهولة الاداء ودقة النتائج المتحصل عليها فضلا عن كونها سريعة ·

2 . طرق التحليل الفيزيوكيمياوية Physiochemical Assays

هناك أنواع عديدة من طرق التحليل الفيزيوكيمياوية تستخدم في الكشف عن النواتج الخام لعملية التخمر وتقديرها ، وان اختيار طريقة تحليل معينـة يعتمد على اختيارية التفاعل أو التحليل الكيمياوي نظرا لاحتواء سوائل التخمر على مركبات عديدة فضلا عن تلك التي يراد تقديرها · وفي الحقيقة ، يستلزم الامر في بعض الحالات اجراء تنقية مبدئية لناتج التخمر قبل اجراء التحليل ·

ولقد تطورت طرق التحليل الفيزيوكيمياوية على أساس من الدراسات التي تربط بين تركيب المادة وخواصها ، والتي ينتج عنها علاقات بيانية على هيئـة منحنيات العلاقة بين التراكيب وخاصية طبيعة معينة · وعن طرق هذه المنحنيات يمكن تعيين المكونات الثابتة وغير الثابتة وتراكيزها في المواد التي تتم دراستها ·

واعتمادا على الخواص الفيزيوكيمياوية للمادة ، امكن التوصل الى عـدة طرق لتقدير المواد تقديرا كميا · ومما هو جدير بالذكر انه لاتوجد حدود فاصلة بين الطرق الفيزياوية التي تعتمد على الخواص الفيزياوية فقط وبين الطـرق الفيزيوكيمياوية وغالبا مايوضع كل منهما تحت اسم الطرق المعتمدة على الاجهزة ·

وقد اخذت طرق التحليل الفيزيوكيمياوية أخيرا في الانتشار وهذا يرجع

الى حساسيتها العالية مقارنة بالطرق العادية اذ يمكن بواسطة هذه الطرق تقدير تركيزات تصل الى حوالي $10^{-9} - 10^{-10}$ جزيء / لتر بينما تستطيع الطرق العادية ان تقدر 10^{-5} جزيء / لتر من نفس المادة · والى جانب ذلك تعد الطرق الفيزيوكيمياوية من الطرق الاختيارية اذ يمكن تقدير مكون ما في وجود مكونات أخرى لا تتداخل في التقدير ، وبالتالي لا يحتاج المحلل الى العمليات المعقدة التي تتم في الطرق العادية ·

وايضا من ميزات هذه الطرق ، هو امكانية تقدير اكثر من مادة واحدة في نفس النموذج ويمكن تقسيم طرق التحليل الفيزيوكيمياوية الى طرق مباشرة واخرى غير مباشرة ·

ففي طرق التحليل المباشرة ، تؤخذ خاصية معينة كوسيلة لتقدير كمية المادة وذلك من منحني العلاقة بين التركيب وخاصية طبيعة معينة ،وعادة مايتم عمل المنحني في صورة منحني قياسي Standard curve في مدى مناسب من تركيزات المادة النقية ويستعمل هذا لتقدير تركيز المجهول ·

اما الطرق غير المباشرة ، فانها تستخدم خاصية استنتاج نهاية التفاعل الكيمياوي بين الكاشف reagent المستعمل وبين المكون المراد تقديره ، وفي هذه الحالة تقوم بوظيفة الدليل الحساس في التحليل الحجمي لتقدير المكون ·
وفيما يلي عدد من الطرق المستخدمة في التقدير الوصفي والكمي لمكونات بيئة ونواتج التخمر ·

2 . 1 . طرق تقدير الكثافة والوزن النوعي Density and Specific Gravity

تعرف كثافة المادة بأنها كتلة تلك المادة (بالغرامات) لكل وحدة حجم (بالسم^3) عند درجة حرارة معينة · بينما يعرف الوزن النوعي بأنه النسبة بين وزن وحجم معين من المادة عند درجة حرارة معينة وبين نفس الحجم من الماء على درجة حرارة 4°م ·

وتعبر هذه القيمة عن الوزن الحقيقي للمادة عند تلك الدرجة الحرارية اذ

ان كثافة الماء عند حوالي 4° م تساوي الوحدة · ونظرا لصعوبة اجراء التقدير عند درجة حرارة 4 م فقد جرت العادة على اجرائه بدرجة حرارة الغرفة وعليه ينتج الوزن النوعي النسبي ، وهو عبارة عن النسبة بين وزن وحجم معين من المادة عند درجة حرارة معينة الى وزن نفس الحجم من الماء عند نفس الدرجة الحرارية ·

وفي كثير من الحالات نجد ان الوزن النوعي النسبي يكون كافيا الا اذا اريد معرفة الوزن النوعي الحقيقي ، وفي هذه الحالة تضرب قيمة الوزن النوعي النسبي X كثافة الماء عند الدرجة المطلوبة ·

وتبنى الطرق العادية لتقدير الوزن النوعي على اساس النسبة الوزنية لحجمين متساويين ، او النسبة الحجمية لوزنين متساويين · فطريقة قنينة الكثافة Pycnometer وميزان يستفال Westphal balance مبنيتان على مقارنة اوزان الحجوم المتساوية ، اما الهيدرومترات Hydrometers فهي مبنية على مقارنة نسبة حجوم الاوزان المتساوية ·

وتعد طرق قياس الكثافة والوزن النوعي طرقا سريعة لاعطاء مؤشرات اولية من سوائل التخمير المختلفة قبل بدء التخمر وخلاله وبعده · اذ تستخدم الهيدرومترات بكثرة في قياس تركيز المواد الصلبة الذائبة الكلية مثل هيدرومتر بالنج Ballingاو بركس Brix ° او سكروميتر Saccharometer ، وهذه تستخدم للدلالة على النسبة المئوية للسكروز في المحلول · كما ويستخدم مقياس الكحول (الكحولوميتر) Alcoholmeter في قياس نسبة الكحول بالمحلول اذ يشير الى النسبة المئوية للكحول الاثيلي بالوزن أو الحجم ·
ويجب ملاحظة أن درجة الحرارة تؤثر كثيرا في القياس وعليه ينبغي تقديرها أثناء القياس ومن ثم تصحيح قراءة الهيدرومتر للوصول الى القراءة الصحيحة · وهناك جداول خاصة موجودة في اي كتاب عن طرق التحليل تعني بتصحيح درجة الحرارة بالنسبة لقراءة الهيدرومتر ·

2 . 2 . التبخير والتقطير Evaporation and Distillation

وتعد هذه من الطرق الشائعة في تنقية المذيبات او في فصل مخاليط المحاليل

القابلة للامتزاج مع بعضها . كما هو الحال في تقدير الكحول الناتــج من بعض التخمرات الكحولية مثل الكحول الصناعي والبيرة والنبيذ والمشروبات المقطرة . اذ تؤخذ البيئة المتخمرة ويفصل ناتج التخمر (الكحول على سبيل المثال) بالتقطير على اساس الاختلاف في درجة غليان مخاليط الماء والكحول . ويعد جهاز مقياس الكحول Ebulliometer أبسط وسيلة مباشرة لتقدير نسبة الكحول في بيئـة التخمر . او ان يقطر الكحول من بيئة التخمر ويفصل نقيا ومن ثم تقدير تركيزه بوسائل اخرى مثل استخدام الهيدرومتر ، او باستخدام قنينة الكثافة Pycnometer لمعرفة وزنه النوعي الذي يمكن ان يحول الى تركيز وزني او حجمي من جـــداول خاصة . او بقياس معامل انكسار السائل المقطر وتحويل ذلك الى ما يقابله من تركيز ، أو بتحويل الكحول الى حامض الخليك بعملية أكسدة كيمياوية بثنائـي الكرومات .

2 . 3 . التحليل الحجمي والوزني Volumetric and Gravimetric Analysis

تحتوي بيئة التخمر على العديد من المركبات المختلفة التي يمكن تقـديرها كميا بطرق حجمية أو وزنيـة منهـا السكريات والاحماض العضـوية والبروتينات والاحماض الامينية والكحولات وغيرها . وان اسـتعمال طـريقة التحليـل المعينة يتوقف على سهولة اجرائها ودقة النتائج المتحصل عليها للوقوف على سير عمليـة التخمر خطوة بخطوة . اذ يمكن التأكد من سلامة العملية التخمرية وبدء تراكـم النواتج المرغوب وحدوث التلوث أو دخول التخمر الى مرحلة غير مرغوبة . وايضا فان هذه الطرق التحليلية تعطي فكرة سريعة عن موعد اضافة بعض المواد المغذية الى بيئة التخمر للوصول الى الناتج المرغوب . ويعـد تسحيح حجم معلوم من بيئة التخمر مع قلوي معلوم التركيز طريقة شائعة في تقدير الحموضة الكلية . ففي التخمرات الكحولية لانتاج المشروبات الكحولية يعد تراكم حامض الخليك في بيئة التخمر مؤشرا على دخول التخمر مرحلة غيـر مرغوبة كنتيجـة للتهـوية الزائدة والتلوث بالاحياء المجهرية الهوائية . في حين يمكن متابعة انتاج الاحماض العضوية كحامض اللاكتيك والستريك في بيئة انتاجهما من التسحيح المتتابع خلال فتـــرة التخمر بقاعدة معلومة العيارية وبوجود دليل لوني أو باستخـدام طريقة التسحيح

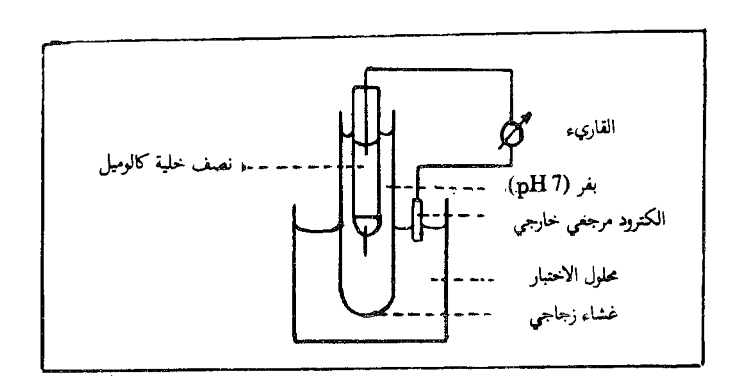
بواسطة فرق الجهد الكهربائي Potentiometric titration بدون اضافة دليل لوني خصوصا عندما يكون المحلول نفسه ملونا بحيث يصعب معرفة نقطة الانتهاء من التسحيح • واذا كان الحامض له المقدرة على تكوين املاح غير ذائبة في بيئة التخمر ، فانه بالامكان ترسيبه وغسله وتجفيفه ثم وزنه لمعرفة كميته • وبعض الاحماض العضوية وخصوصا المتطايرة منها يمكن تقطيرها بالبخار مباشرة من بيئة التخمر وجمع المتقطر وتسحيحه بقاعدة معلومة التركيز لمعرفة كميتها • واذا كانت الاحماض العضوية عالية الوزن الجزيئي فقد تفصل من بيئة التخمر بالامتزاز على مادة ماصة adsorbent مناسبة او فصلها بواسطة مبادل ايوني مناسب ثم استردادها بكمية مناسبة من محلول الاسترداد واخيرا اجراء التسحيح بقلوي قياسي وكذلك يمكن تقدير السكريات المتبقية في بيئة التخمر حجميا او وزنيا لمعرفة المقدار المستهلك منها من قبل احياء التخمر المجهرية وذلك لحساب الناتج المتوقع من العملية التخمرية • وفي تقدير بعض نواتج التخمر قد تتبع طريقة التحليل الحجمي او الوزني او طريقة تحليل لونية colorimetric •

4 • قياس الاس الهيدروجيني pH-measurement

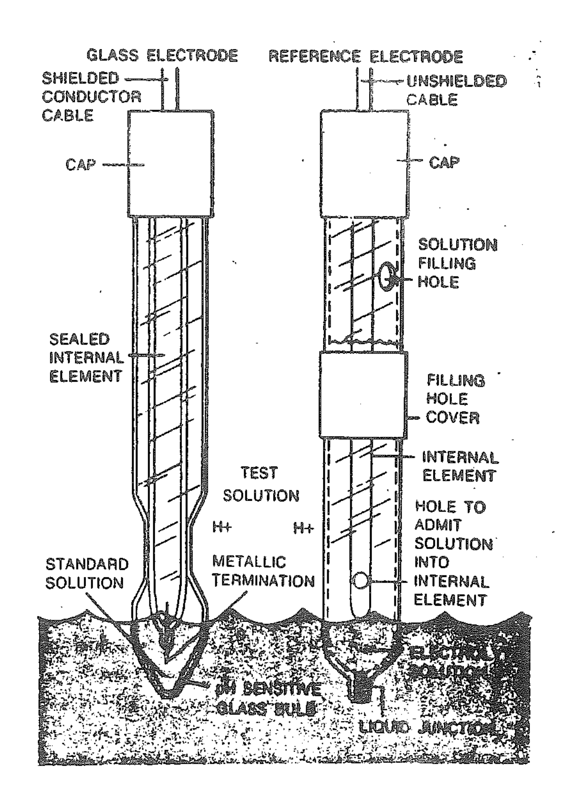
يعد الاس الهيدروجيني (pH) في الانظمة البيولوجية ذا اهمية كبيرة تفوق اهمية الحموضة الكلية • فهو مهم في تأثيره في الاحياء المجهرية ، وفي اضفاء ظلال لونية معينة ، وفي جهد الاكسدة والاختزال ، وفي نسب المكونات الحرة الى المرتبطة وغيرها • وتجري معظم التخمرات تحت ظروف محكمة ومسيطر عليها من الـ pH • وتكون اجهزة التخمر مزودة بميكانيكية معينة للكشف عن قيم pH بيئة التخمر ولتثبيت هذه القيم خلال التخمر ، اذ يتضمن أخذ نماذج من البيئة لتقدير الـ pH بين فترة واخرى يليه اضافة من القلوي او الحامض الى بيئة التخمر الرئيسة حسب الحاجة •

والاس الهيدروجيني (pH) ما هو الا دالة لوغاريتمية لتركيز ايونات الهيدروجين الحرة في المحلول • ويختلف عن الحموضة الكلية القابلة للتسحيح في كون الاخيرة قياسا لايونات الهيدروجين الحرة والمرتبطة • وعليه لاتوجد علاقة مباشرة بين الاس الهيدروجيني للمحلول وبين حموضته الكلية ، الا أنه عن طريق قياس الاس الهيدروجيني يمكن اخذ فكرة عن درجة حموضة المحلول •

وعادة يقاس الاس الهيدروجيني باجهزة مميزة pH-meters ، وهـــذه الاجهزة تستخدم الكترودات (أقطاب كهربائية) زجاجيـة لقياس فعاليـة أيـون الهيدروجين • وتتكون الالكترودات الزجاجية من أغلفة زجاجية رقيقة يوجـــد عبرها وسيلة نقل الجهد المنسوب الى فعالية ايون الهيدروجين في المحلول • والاساس العام للقياس يعود الى أن سطح الزجاج يصبح مهدرتا ويكون هلاما عندما يوضع في المحلول المراد اختباره ، حيث تقوم أيونات الهيدروجين بنقل شحنة الى هـذا السطح • ويمر التغير ذرة بعد ذرة خلال الجزء الجاف والى السطح الداخلي • ويوجد على السطح الداخلي للالكترود الزجاجي محلول منظم (بفر) pH 7.0 • وهناك الكترود قياسي من الكالوميل مغلق ومغمور في المحلول المنظم كما هو مبين في الشكل (12 . 1) والشكل (12 . 2) وذلك للحفاظ على البفر عند جهد معلوم ولاكمال الخلية الكهربائية • ويكون هذا الالكترود الاخير مرتبطا بالكترود مرجعي مغمور في المحلول المراد اختباره •



الشكل (1.12) • رسم تخطيطي لالكترود زجاجي وما يرتبط به



الشكل(12 . 2)۰ الكترود قياس الاس الهيدروجيني (PH)

والاسلوب المعتاد في التشغيل هو بوضع الالكترودان في محلول معروف ال pH .(محلول بفر) ومن ثم ضبط مقياس الجهاز ۰ ثم يوضع الالكترودان في المحلول المراد اختباره ، فأي اختلاف في فعالية ايون الهيدروجين عن تدريج ال pH . سيسبب في فرق جهد عبر الغشاء الزجاجي ومن ثم اضطراب النظام ۰

لذلك فان مقدار فرق الجهد اللازم لاعادة توازن الجهاز يتم قراءته بشكل وحدات الـ pH .

2 . 5 . التحليل بالالكترودات الايونية الانتقالية Selective Ion Electrodes

في السنوات الاخيرة ، أصبحت الالكترودات التي تفصل الايونات انتقائيا وتقيس احدها بشكل تفضيلي من الوسائل الشائعة الاستعمال . وتكمن ميزة هذه الالكترودات في تخصصها وقدرتها على قياس كميات ضئيلة جدا بدرجة عالية من الدقة . وتقع هذه الالكترودات في نفس قسم الالكترودات الزجاجية الخاصة بقياس فعالية ايون الهيدروجين PH . اذ تسبب هذه الالكترودات في جهد كهربائي يمكن ان يطور ليتناسب طرديا مع تركيز الايون أو الغاز موضع السؤال . وتحتاج معظم الالكترودات الى وجود الكترود مرجعي يجهز اتصالا كهربائيا بالمحلول المختبر والى فولتية ثابتة لاغراض المقارنة .

واساسا ، سواء كان الغاز هو الذي يقاس أم الايونات ، فان هذه الالكترودات تتكون من غشاء حامل ، ومحلول مالئ داخلي ، واداة حدوث الاتصال الكهربائي ، وجسم مناسب ، والوصلات الكهربائية الضرورية . وتشير معادلة نيرنست :

$$E = E_0 + 2.3 \frac{RT}{nF} \log A$$

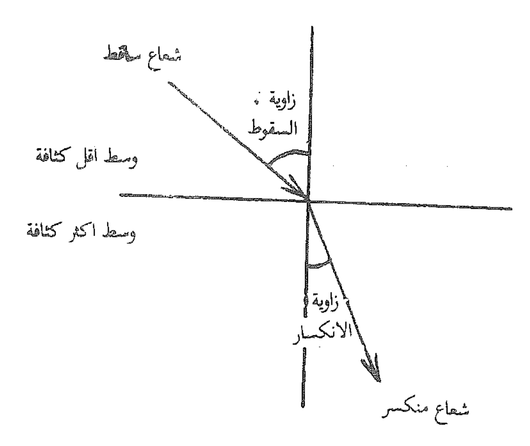
الى علاقة الجهد المولد E بالتركيز ، وبصورة أفضل بفعالية الايون موضع السؤال في المحلول المختبر A .

وبالامكان تقسيم استعمال هذه الالكترودات الى ثلاث فئات :ـ

(أ) القراءة المباشرة لفرق الجهد ، (ب) طريقة الاضافة ، (جـ) مرشد نقطة نهاية التسحيح . ويمكن ادخال الانزيمات الثابتة **immobilized enzymes** في هذه الالكترودات ، ومن ثم يمكن قياس نواتج التفاعلات الانزيمية . وتبدو هذه الطريقة مفيدة في الانظمة الانزيمية المنتجة لغاز ثاني اوكسيد الكربون ، حيث يمكن ادخال الكترود حساس للغاز وتقاس مادة التفاعل المعنية بصورة غير مباشرة عن طريق قياس التفاعل الانزيمي وانطلاق غاز ثاني أوكسيد الكربون .

6 . 2 . طرق القياس بانكسار الضوء Refractometric Methods

يستخدم تقدير معامل الانكسار refractive index في بعض التخمرات ، اذ يعد معامل انكسار المواد النقية ثابتا ومميزا طبيعيا لها ٠ ويبين الجدول(12 . 1)معامل انكسار بعض المذيبات الشائعة ٠ وباستثناء الكحول المثيلي فان معامل انكسار المحاليل المائية يكون اكبر من معامل انكسار الماء النقي الذي يساوي 1.3330 . والاساس العلمي يعتمد على انه اذا مر شعاع ضوئي من وسط الى آخر فانه ينحرف عن اتجاهه الاصلي أي ينكسر ٠ والزاوية التي يكونها الشعاع الساقط مع العمود المقام على سطح الانفصال عند نقطة السقوط تدعى بزاوية السقوط ، والزاوية التي يكونها الشعاع المنكسر مع العمود النازل من نقطة الانكسار تدعى بزاوية الانكسار ٠



ويطلق على النسبة بين جيب زاوية السقوط وجيب زاوية الانكسار بمعامل الانكسار ٠ وهذه تكون ثابتة دائما بالنسبة لاي وسط عند طول موجي معين معين ودرجة حرارة ثابتة ٠ ويوضح معامل الانكسار التغير في سرعة الضوء المار من وسط الى آخر ، وهو مساو لنسبة سرعة الضوء المار في كلا الوسطين ٠

ويختلف معامل الانكسار باختلاف طول موجة الضوء ، فهو يزداد من الاحمر الى البنفسجي من الوان الطيف ، أي أنه يزداد بنقصان طول الموجة ٠ وعندما

تنكسر اشعة الضوء البيضاء فانها تتحلل الى ضوء ذي الوان منشورية مختلفة prismatic colors ، وهذا الانكسار غير المتجانس للضوء ذي اطوال الموجات المختلفة يطلق عليه بالانتشار dispersion • وعادة يقل معامل الانكسار للسوائل والجوامد بارتفاع درجة الحرارة ، ويظهر هذا بوضوح في السوائل أكثر من الجوامد • ويقل معامل انكسار المحاليل السكرية بتأثير درجة الحرارة بنفس النسبة تقريبا التي تؤثر في وزنها النوعي • لذلك فان جداول تصحيح الحرارة لهيدرومتر بركس او بالنج يمكن استخدامها لتصحيح معامل الانكسار ، اذ تؤخذ قراءة معامل الانكسار على درجة حرارة الغرفة ثم تحول الى نسبة مئوية من السكر عند تلك الدرجة ثم تصحح القراءة بعد ذلك • ولكن المفضل ضبط درجة حرارة السائل المراد اختباره عند الدرجات القياسية (20° م أو 25° م) ، علما بأن كل خطأ في جزء من عشرة اجزاء درجة الحرارة يؤدي الى خطأ في معامل الانكسار بمقدار وحدة او وحدتين من الرقم العشري الرابع •

والاجهزة المستخدمة في قياس معامل الانكسار تسمى الرفراكتوميترات Refractometers ومنها أنواع عديدة أهمها رفراكتوميتر آبي Abbe Refractometer ورفراكتوميتر الجيب Pocket Refractometer .

2 . 7 . طرق القياس بالاستقطاب الضوئي Polarimetric Methods

يعد قياس استدارة الضوء المستقطب واحدا من افضل الطرائق المستخدمة في قياس تراكيز وتقدير المركبات الفعالة (النشطة) ضوئيا • اذ تقوم هذه المركبات بادارة الضوء المستقطب الى اليمين او الى اليسار تبعا لطبيعة تركيبها الجزيئي • ويصطلح على المركبات التي تعمل على استدارة الضوء المستقطب باتجاه عقرب الساعة (الى اليمين) بتسميتها (d) اي يمينية الدوران dextrorotatory والتي تديره عكس اتجاه عقرب الساعة (الى اليسار) اسم (l) اي يسارية الدوران Levorotatory . وهنا ينبغي التثبت من أن هذه الصفة ليس لها علاقة بصيغ D- و L- للمركب • ولا تنحصر الفائدة من قياس الاستقطاب الضوئي بتقدير تراكيز المركب الفعال ضوئيا بل أنها ذات فائدة كبرى في التعرف على نقاوته أيضا وتقاس استدارة الضوء المستقطب باستخدام جهاز

قياس الضوء المستقطب (قياس الاستقطاب Polarimeter) . ويتألف الجهاز من الاجزاء التالية والموضحة في الشكل (12 . 4) والشكل (12 . 3) .

1 . مصدر الضوء Light source — وتحتوي بعض الاجهزة على مصباح الصوديوم أو مصباح تنجستن Tungstun اعتيادي مع مرشح ثنائي الكرومات لتوليد ضوء اعتيادي ذي طول موجي قدره 589 نانوميتر .

2 . وحدة الاستقطاب Polarizer — وتتألف من منشور نيكول Nicol prism الذي يتكون من منشورين ملتصقين ببعضهما بواسطة بلسم كندا. ويقوم هذا الجزء بتحويل الضوء الاعتيادي (يتذبذب في عدة مستويات عمودية على مصدر الضوء) الى ضوء مستقطب (يتذبذب في مستوى واحد) .

3 . خلية النموذج Sample cell — وهذه تكون مصنوعة من الزجاج وذات طول معين معلوم .

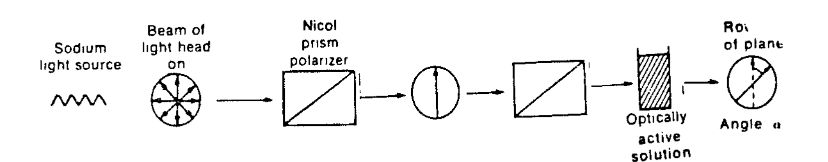
4 . المحلل Analyzer — ويتكون اساسا من قرص مدرج بتدريجات عشرية يتوسطها صفر ، وتكون التدريجات على الجهة اليمنى او اليسرى لنقطة الصفر متساوية ولكنها في الاشارة فحسب . والقراءة المتحصلة ماهي الا درجة الاستدارة التي تعبر عن مقدار التدوير الذي حصل للضوء المستقطب بالدرجات ، حيث يمكن بواسطتها حساب تركيز المركب الفعال ضوئيا في حالة معرفة الاستدارة النوعية له ، او يمكن استعمالها للتعرف على نقاوة محلول معلوم التركيز من المركب وذلك بحساب الاستدارة النوعية ومقارنتها مع القيمة المستخرجة من المصادر . ويتم الحساب تبعا للمعادلة الاتية :

$$[\alpha]^T_D = \frac{\alpha}{l c}$$

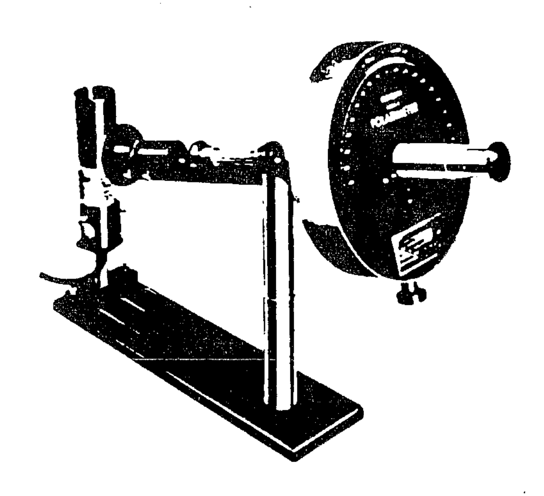
حيث : $[\alpha]^T_D$ = الاستدارة النوعية على درجة حرارة (T) وطول موجي مساو الى ضوء الصوديوم (D-line) والذي يساوي 589 نانوميتر

α = درجة الاستدارة المقاسة بالدرجات

l = طول خلية النموذج (مسار الضوء المستقطب في النموذج) بالديسيمتر .



الشكل (12 . 3) رسم تخطيطي للاستقطاب الضوئي



الشكل(12 . 4)جهاز قياس الضوء المستقطب

c = تركيز المركب الفعال ضوئيا بوحدات غم/مل .

وهناك صيغ أخرى للمعادلة تستعمل تبعا لوحدات التركيز المستعملة ، كما نستعمل الصيغة التالية في حالة كون وحدات التركيز غم/100 مل :

$$[\propto]^{T}_{D} = \frac{\propto (100)}{l\,(g)}$$

حيث : g = وزن المركب بالغرام/100 مل

2 . 8 . التحليل الطيفي Spectrophotometry :-

تستخدم طرق التحليل الطيفية أنواعا متعددة من المطياف (سبكتروفوتوميتر) Spectrophotometer لقياس كمية امتصاص الضوء المنظور أو غير المنظور ـ الاشعة فوق البنفسجية ـ المار من المحاليل الملونة أو الشفافة ، أو شدة الوميض المنبعث من المواد المنيرة (الفلورة) fluorescence أو المنبعث منها عند تعريضها للاشعة . واو ألقينا نظرة بسيطة لاجهزة القياسات البصرية لوجدنا مثلا أن أجهزة المقارنات البصرية visual comparators تعتمد على أشياء بسيطة من أهمها تخيل العين البشرية التي ينتابها شيء من التعب وكذلك قلة حساسيتها التي يصعب تفاديها تحت طول موجي 450 نانوميتر واعلى من 675 نانوميتر .
في حين تعد اجهزة القياسات الضوئية ذات المرشحات filter photometers (أو أجهزة قياس الالوان colorimeters) أكثر ملاءمة لكثير من الطرق الروتينية التي لا تتضمن أطيافا معقدة . في حين أن لاجهزة القياس الطيفية (سبكتروفوتوميتر) مدى واسعا من الدقة في مجال تلك الاطياف المعقدة ، وهذه الاخيرة لها القدرة على استخدام عرض ضيق لحزمة الطاقة الاشعاعية أي أن التقدير يتم على اساس طول موجة الشعاع .

ان تحديدات معظم الطرق اللونية تقع اساسا على عاتق التفاعلات الكيمياوية التي عليها تتحدد دقة الطريقة ، وليست بالقدر الذي يقع اساسا على الاجهزة الملائمة للتقدير . وتتوقف معظم الصعوبات التي تواجه هذه الطرق من التحليل على مدى موازنة واختيار التفاعل المسبب للون مع المادة المراد تقديرها . وعموما هناك عدد من النقاط الواجب وضعها في الاعتبار عند اختيار اي طريقة لونية منها :-

(1) نوعية تفاعل تكوين اللون ٠

(2) ثبات الوقت للنظام بالنسبة لمظهر اللون ٠

(3) تأثيرات كل من الكواشف reagents الزائدة ، والايونات الغريبة المختلفة ، والاس الهيدروجيني ، والقوة الايونية ، ودرجة الحرارة ٠

(4) مطابقة قانون بيير Beer's law (هذه المطابقة ضرورية عند حدود معينة) ٠

(5) الامتصاصية الجزيئية (المولية) molar absorptivity

وفضلا عن تقدير خطأ التركيز النسبي وأهمية عرض فتحة الضوء في في التحكم في الطاقة الاشعاعية الداخلة الى العينة ، ينبغي توجيه اهتمام خاص الى اختيار طول الموجة الملائم لعملية التقدير ٠ اذ تعد هذه العملية أساس كل التقديرات اللونية ، وتعمل أجهزة القياس الطيفية على انجاز هذا بنجاح وذلك عن طريق رسم العلاقة بين اطوال الموجات المختلفة والنفاذية transmittance أو نسبة النفاذية لتركيز واحد من المحلول الملون ، اذ يتحصل على منحني مقلوب القمة تمثل قمته اقل نفاذية ممكنة عند الطول الموجي الملائم ٠ اما اذا رسمت العلاقة بين أطوال الموجات والامتصاص الضوئي absorbance فانه يتحصل على منحني معاكس للسابق تكون قمته لاعلى ، حيث تمثل هذه القيمة اعلى امتصاص للون المختبر ٠

لذلك فان السبكتروفوتوميتر من النوع الذي يقيس الالوان يكون حساسا للضوء المنظور في مدى يتفاوت بين 380 — 800 نانوميتر ٠ فهو يقيس مقدار الضوء عند طول موجة معينة ، او حزمة ضيقة من الاطوال الموجية ، الممتص كحزمة ضوئية تمر خلال المحلول الملون ٠ وكل لون يمتص الضوء عند طول موجي معين ٠ ان نواتج التخمر التي تكون ملونة بحد ذاتها ولكن بالوان تختلف عن البيئة يمكن قياسها مباشرة في جهاز قياس الالوان colorimeter او ربما بعد خطوة تنقية بسيطة ٠ وعليه يتم اختيار طول الموجة الفعلي للشعاع المستخدم بحيث يستطيع المركب المراد تقديره من امتصاص الالوان الغريبة من البيئة اقل ما يمكن ٠ وكذلك بالامكان تقليل تأثير الالوان الغريبة باستخدام بيئة غير ملقحة ومخففة الى نفس

المدى كما هو الحال مع النموذج وذلك لضبط الجهاز على 100 % نفاذية ضوئية ٠ ويحضر منحني قياسي للعلاقة بين الامتصاص الضوئي والتراكيز المختلفة من المركب النقي اذا كان الاخير متيسرا ٠ ومن الملائم ان يطابق هذا الرسم قانون بيير ، أي ينبغي أن تكون العلاقة بين شدة اللون (الامتصاص) وتركيز ناتج التخمر خطية في مدى تراكيز معينة ٠

وقد لايكون لناتج التخمر نفسه لون منظور ، لذلك يبقى جهاز التحليل اللوني قابلا للاستخدام مع ناتج من هذا النوع ٠ وفي مثل هذه الحالات يمكن لناتج التخمر ان يتفاعل مع كاشف كيمياوي معين لاعطاء ناتج ملون ٠ فالاحماض الامينية لا تكون ملونة بحد ذاتها الا انها تتفاعل مع النينهيدرين ninhydrin تحت ظروف مناسبة لتكوين لون ارجواني يمكن قياسه باجهزة القياسات اللونية ٠

كما يمكن انجاز بعض التحليلات الطيفية لنواتج التخمر غير الملونة او التي لا تتفاعل مع العوامل الكيمياوية لاعطاء نواتج منظورة ، اذا كانت هذه المركبات قادرة على الامتصاص او الفلورة عند تعريضها لاطوال موجات معينة من الاشعة فوق البنفسجية في مدى طول موجي قدره 200 — 380 نانوميتر تقريبا ٠ وعليه فالمركبات المحتوية على روابط مزدوجة متبادلة conjugatted double bonds كتلك الموجودة في الحلقات الاروماتية ،تمتص دائما الاشعة فوق البنفسجية عند عدة اطوال موجية من طيف الاشعة فوق البنفسجية وفي المقابل فان بعض المركبات كالرايبوفلافين يشع وميضا فلوريا عند أطوال موجية معينة من الاشعة فوق البنفسجية ٠ ويكون اساس التحليل مشابها لتقديرات الضوء المنظور ، اذ يتم اختيار اطوال موجات فوق البنفسجية للسماح باقصى فلورة (انارة) fluorescence او امتصاص للاشعة فوق البنفسجية بالنسبة لناتج التخمر مع اقل نشاط ممكن للمركبات الملوثة ويحضر منحني قياسي بالطريقة التي مر ذكرها سابقا ٠

ان استخدام التحليل الطيفي في تقدير ناتج تخمري مجهول مسبقا يكون صعبا ، وقد يرجع ذلك الى عدم تيسر المركب النقي لاستخدامه كمرجع قياسي في تحضير المنحني القياسي ٠ ولكن اذا كان ناتج التخمر ثابتا نسبيا فانه بالامكان اخذ نموذج

من سائل التخمر وتجفيفه او تجفيده وحفظه للاستخدام كمرجع قياسي ٠

واثناء اداء التحليل الطيفي قد يبرز تساؤل عن امكانية حدوث هدم لناتج التخمر خلال التحليل ، أو تداخل الناتج مع المكونات الاخرى الموجودة في النموذج ، أو اضمحلال اللون المنظور أو الوميض وهلم جرا ٠ واذا كان هناك شيء من حدوث مثل هذه الظواهر فمن المستحسن ادخال مادة قياسية داخلية معلومة التركيز الى الى تخفيفات نموذج التخمر ٠ وعليه يضاف مقدار بسيط ممكن كشفه من المركب الى تخفيف سائل التخمر المحتوي على ناتج التخمر المشابه له ، ويقارن هذا مع تخفيف اخر من سائل التخمر لايحتوي على المركب القياسي المضاف ٠ وبطبيعة الحال ينبغي ان تختلف نتائج التقديرين في كمية المركب القياسي المضاف فقط ٠ ويتم الكشف على اضمحلال الامتصاص في الضوء المنظور أو في الاشعة فوق البنفسجية أو في مستوى الفلورة فوق البنفسجية بانجاز التقديرات على فترات زمنية مختلفة بعد تحضير النموذج ٠ ونتيجة لذلك يتم اختيار فترة زمنية معينة يمكن خلالها الحصول على نتائج صحيحة ومتكررة ٠

وبالامكان استخدام التحليل الطيفي للتعرف على وجود بعض المركبات غير المتوقعة في سائل التخمر ٠ وينطبق هذا على المركبات التي تمتص الاشعة فوق البنفسجية ، اذ يتم اختيار نموذج مخفف من سائل التخمر في قدرته على امتصاص الاشعة فوق البنفسجية وعلى مدى واسع من اطوال الموجات ٠ واذا تم ربط جهاز تسجيل بجهاز السبكتروفوميتر يتحصل على تحليل طيفي يبين ذروات امتصاص الاشعة فوق البنفسجية عند أطوال موجات معينة في حين تظهر أطوال موجات أخرى ذروات صغيرة أو معدومة ٠ وهذه الذروات الكبيرة والصغيرة تكون مترافقة مع بعض المجاميع المعينة ضمن جزئية المركب وتعد سمة مميزة له ٠ واذا اضيف حامض أو قاعدة الى نموذج التخمر فان ذلك يحدث تغيرا في مواقع هذه الذروات الكبيرة والصغيرة ٠

2 . 9 . طرق قياس العكارة Turbidimetry and Nephelometry

ان تقدير حجم الكتلة الخلوية يهيء طريقة بسيطة وسريعة للناتج الخلوي اذا كانت الخلايا الميكروبية هي المكونات غير الذائبة الوحيدة في النموذج ٠ اذ يتم

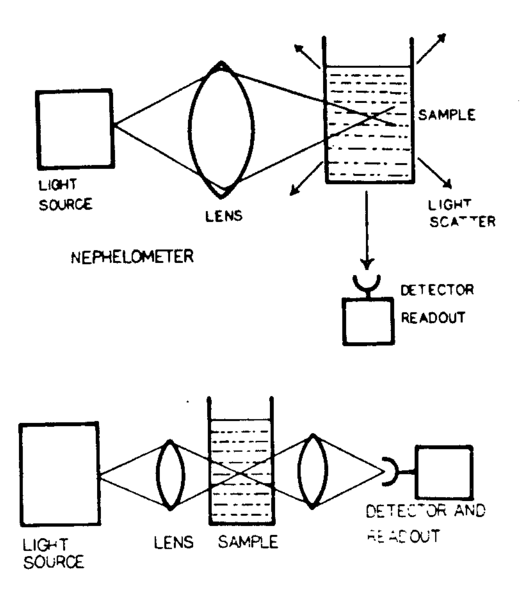
نبــذ centrifugation بروتينات سائل التخمــر مع خــلاياه في أنابيب نبذ مدرجة ويقاس حجم الخلايا المترسبة بالسنتمترات المكعبة ٠ الا ان هناك طــريقة أخرى لقياس الناتج الخلوي من العملية التخمرية وهي طريقة قياس عكارة الوسط لمعرفة تركيز الخلايا وأية متخلفات أخرى غير ذائبة ٠

وتعتمد طريقة تقدير العكارة على قدرة الجسيمات العالقة في المحلول على تشتيت scatter أو امتصاص الضوء ٠ فاذا مرت حزمة ضوئية خلال محلول به حبيبات قابلة لتشتيت الضوء بشدة مقدارها (I_o) ، فان (I_s) ممثل شدة الاشعة المشتتة في انجاز عمودي على اتجاه الشعاع الداخل ٠ وألى جانب ذلك يلاحظ في مثل هذه المحاليل ان جزءا من الاشعة الداخلة سوف يمر خلال المحلول بشدة مقدارها (I_t) وهذه هي النافذة خلال المحلول ، والتي تكون اقل في شدتها من شدة الضوء الساقط نظرا لعمليات الامتصاص والتشتت التي تجد للضوء نتيجة لوجود الحبيبات الصلبة المعلقة ٠ وعليه نجد ان الطرق التي تعنى بدراسة شــدة الضــــوء المشتت Scattered light او (I_s) تسمى Nephelometry ، اما الطرق التـــي تعتمد على قياس شدة الضوء النافذ transmitted light او (I_t) فتسمــى Turbidimetry ، ويوضح الشكل (12 . 5) مقارنة بين نظامي الطريقتين ٠

وقد ثبت فعلا أن شدة الضوء المشتت تعد دالة تعبيرية طردية لعدد الجسيمات المنتشرة في الوسط اي على تركيز وسط التشتت ، ولن تتوقف شدة الضوء المشتت على عدد الجسيمات فقط بل تتأثر ايضا بواسطة حجم هذه الجسيمات ٠

ويتضح من ذلك ان كلمة عكارة Turbidity تعزى للخواص الضوئيـــــة للمعلقات ويمكن اعتبارها نسبة الضوء المنعكس الى الضوء الساقط على المعلـــق وتعتمد شدة الضوء المنعكس بواسطة المعلق على التركيز عندما تكون جميع العوامل الاخرى ثابتة ٠ وهذا يعد ذا فائدة كبيرة في حالات كثيرة عندما يتم تقدير راسب ما بدون فصله من المحلول وخاصة في الحالات التي يصعب فيها ترشيح وغســيل وتجفيف الراسب او عندما تكون سرعة التقدير مطلوبة ٠ وتقع طريقة تقدير في ثلاث مجاميع : —

(1) مقارنة نسبة الضوء المنعكس او المشتت scattered light (Tyndall light



الشكل (5.12) مقارنة بين النظام البصري في كل من ال Nephelometer وال Turbidimeter

مع الضوء الساقط .

(2) مقارنة نسبة الضوء النافذ transmitted light من المعلق مع الضوء الساقط .

(3) قياس تأثير خبو (انقضاء) الضوء Extinction effect ، وهو طول العمق الذي يختفي عنده هدف تحت المعلق .

وتعد الطريقة الاولى المعتمدة على ظاهرة تندال Tyndall ratio من اكثر الطرق حساسية للتركيزات المخففة وتسمى اجهزة القياس الخاصة بها Tyndallmeters ، في حين الطريقة الثالثة المعتمدة على تأثير الخبو تستعمل

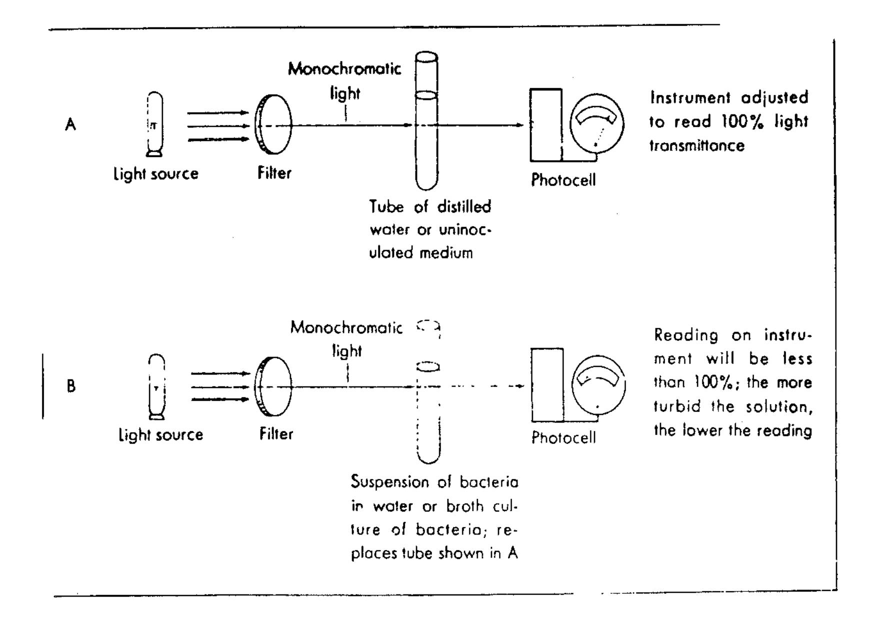
في حالة التراكيز العالية ، في حين تستخدم الطريقة الثانية في حالة التراكيز المتوسطة ٠

وتعد قياسات العكارة turbidity جيدة في حالة تشتت جزء مهم من الحزمة الضوئية الساقطة على المحلول ، ولكن اذا حدث وتشتت جزء بسيط من الضوء الساقط فان قياسات nephelometry تعد الافضل ٠ ويمكن استخدام اغلب اجهزة القياسات الضوء طيفية (السبكتروفوتوميتر) في قياس عكارة المحاليل كما هو الحال في التحكم بنمو الخميرة في بعض التخمرات ٠

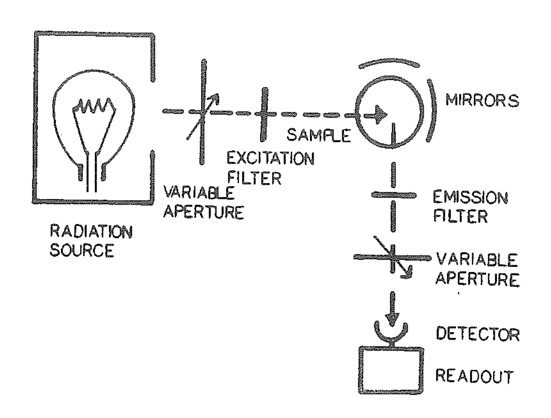
وطريقة القياس هي باخذ مقدار من النمو الخلوي المعلق في بيئة النمو ويخفف الى مدى معين من العكارة يمكن بسهولة قياسه على شكل امتصاص ضوئي absorbance او كثافة ضوئية optical density في اي جهاز تحليل لوني أو ضوء طيفي مع أمكانية استخدام مرشح filter أو موحد الضوء monochromator لإلافاة الالوان المصاحبة لبيئة النمو كما هو موضح في الشكل (6.12) ٠ وبالامكان مقارنة القراءة مع نموذج قياسي من بيئة غير ملقحة ولها نفس التخفيف لتعطي قراءة نفاذية ضوئية قدرها 100 % ويمكن مطابقة قياسات العكارة لعدد الخلايا في البيئة مع بعض الطرق الاخرى مثل طريقة العدد بالاطباق plate count وذلك لتحديد العدد الكلي للخلايا في النموذج ٠ وعليه يعمل منحنى قياس للعلاقة بين الامتصاص الضوئي وعدد الخلايا باستخدام معلومات كل سلسلة من تخفيفات المعلق الخلوي ٠ وبتحضير هذا المنحني القياس يمكن بسهولة تحويل قراءة الكثافة الضوئية الى عدد الخلايا في النموذج ٠

2 . 10 . التحليل بالوميض (الفلورة) Fluorometry

ان هذا التحليل هو قياس للضوء المنبعث من مركب سبق تشعيعه بضوء قصير الموجة ٠ وعند تعرض العديد من المركبات الى الاشعة فوق البنفسجية العالية الطاقة فأنها ستبعث اشعاعات ذات موجات أطول نتيجة لعودة الكترونات الجزيئة من حالتها المثارة الى حالة الهمود ٠ ويوضح الشكل (7.12) تركيب جهاز قياس الوميض fluorometer لغرض الاستخدام التحليلي الاعتيادي ٠



الشكل (6.12) رسم تخطيطي لجهاز تحليل لوني يقيس عكارة محلـول التخمر
(حيث : A : تثبيت الجهاز لكي يصـبح جاهـزا للاستعمال
B : تقدير العكارة (او النمو) لمحلول التخمر)



الشكل (7.12) ٠ رسم تخطيطي لجهاز قياس الوميض وحيد الحزمة الضوئية

ويجب أن يشع مصدر الاضاءة مقادير مهمة من الاشعة عند الاطوال الموجية التي تثير الجزيئة المعنية ٠ ويعد اختيار المصابيح الفلورية ، ومصابيح ابخرة الزئبق ، وأنابيب الزينون متيسرا لتغطية المجالات المرغوبة ٠ وتعمل المرشحات الاولية على منع أكبر قدر ممكن من الاشعاعات غير المرغوبة ٠ وتصطدم الاشعة ذات الطول الموجي المرغوب بالمركب وتثير بعض الالكترونات الى مستوى باي π الاعلى طاقة ٠ وتعود الجزيئة الى حالة الهمود مطلقة بروتونا من الطاقة المتصة كفوتون ضوئي مميز (له طول موجي أطول بقليل من الطول الموجي القائم بالاثارة) ٠ وتنطلق الفوتونات المنبعثة في جميع الاتجاهات ٠ وعادة يتم اختيار زاوية الانبعاث الصحيحة بالنسبة للحزمة الضوئية الساقطة من أجل القياس ٠ ويوضع المرشح الثانوي أو مرشح العزل بين حامل النموذج والمكتشف لازالة الاشعة غير المرغوبة ٠ ويمكن لبعض المركبات المتضمنة ان تمتص الاشعاعات الثانوية المنبعثة ، وهذا ما يطلق عليه بالتأثير القامع quenching effect ٠ وعادة تكون شدة الوميض (الفلورة) خطية للتغيرات في التركيزات الخفيفة للمواد الفلورية ويمكن كشف مستويات من بعض المواد تصل الى أقل من 10 مايكروغرام/لتر ٠

ويستخدم هذا النوع من التحليل في تقدير الجليسرول وبعض الفيتامينات في بيئة التخمر ·

11.2 . الاستخلاص Extraction

تعد عملية الاستخلاص من أكثر الطرق شيوعا لفصل وتنقية المواد · اذ قد تأخذ شكل استخلاص مادة صلبة باستخدام سائل أو استخلاص سائل بسائل أخر غير قابل للامتزاج به · وفي الحالة الاولى نجد ان درجة ذوبان المادة المراد استخلاصها في السائل المستخدم في الاستخلاص يعد عاملا اساسيا في تحديد مدى نجاح عملية الاستخلاص ، أما في حالة استخلاص سائل بسائل فان العامل المحدد للنجاح هو درجة الذوبان النسبية relative solubility للمذاب في كلا السائلين وهذه تعرف بمعامل الفصل partition coefficient (C_d) أو نسبة التوزيع distribution ratio ·

$$C_d = \frac{S_1}{S_2}$$

حيث تعبر S_1 عن مقدار المذاب في السائل الاول و S_2 عن مقدار المذاب في السائل الثاني · ويمكن اجراء كلا العمليتين (استخلاص مادة صلبة بواسطة سائل او استخلاص سائل بسائل اخر) اما بطريقة الوجبات batch-wise او بطريقة مستمرة continuous . وعليه يعبر عن الجزء المنقول من المادة في عملية استخلاص واحدة بالاتي : –

$$F = \frac{C_d V_2}{V_1 + C_d V_2}$$

حيث F = الجزء المنقول

C_d = معامل الفصل

V_1 = حجم المذيب الاصلي

V_2 = حجم المذيب المضاف

لذا فان استخدام عدة عمليات استخلاص عوضا عن عملية واحدة سيكون اكثر كفاءة · ويمكن استخلاص اكثر من مركب بنفس الحجم من المذيب ·

ان مبدأ الفصل هذا ، يستخدم في كروماتوجرافي السائل – السائل كما هو الحال في الكروماتوجرافي الورقي والكروماتوجرافي الغازي السائلي ·

ويعتمد الاختلاف في ذائبية المذاب بين المذيبات بالدرجة الاساس على قطبية المذيبات • ويدرج الجدول (4.12) بعض المذيبات الشائعة وخواصها المختلفة • كما ويعزى ثابت الحاجز الكهربائي الى قطبية المذيب •

2 . 12 التحليل الكروماتوجرافي Chromatography

كان لاكشاف وتطور التحليل الكروماتوجرافي بأنواعه المختلفة تأثير كبير على أبحاث التخمر والتنقية اذ جعلتهما يخطوان خطوات سريعة • وقبل اكتشاف هذه الطريقة كان من الصعب الكشف والتعرف على الانواع العديدة من المنتجات التخمرية اضافة الى تقدير كمياتها وخاصة اذا كانت موجودة بمقادير صغيرة في بيئة التخمر • ومع ذلك فقد وفر التحليل الكروماتوجرافي الوسائل المناسبة للكشف عن المركبات في حالتها النقية وغير النقية ، وايضا تقدير هذه المركبات حتى وان وجدت بكميات ضئيلة جدا •

وبتقدم طرق الفصل تمكن الكثير من الباحثين من استخدام التحليل الكروماتوجرافي في ابحاثهم وخاصة تلك المتعلقة بالفيتأمينات والانزيمات والبروتينات والدهون والاحماض ومركبات النكهة وغيرها • وقد غير التحليل الكروماتوجرافي من شكل المختبرات ومعداتها عما كانت عليه منذ اكثر من سنة بل حتى ان الكثير من المصانع تستخدمه بوسيلة او باخرى في عمليات الانتاج المختلفة وفي مختبرات السيطرة النوعية •

والتحليل الكروماتوجرافي هي عملية فصل المخاليط الى مكوناتها في مناطق تركيز او في اوجه تختلف عن تلك التي كانت توجد فيها اصلا ، بغض النظر عن طبيعة القوى المسببة في انتقال المكونات بين وجه وآخر •

وعموما تقسم طرق التحليل الكروموتوجرافي تبعا للاساس العلمي الذي يتم به الفصل الى الاتي : —

1.12.2 التحليل الكروماتوجرافي بالامتزاز Adsorption Chromatography

تعد القوة المسئولة عن هذا التحليل القوة السطحية الطبيعية الخاصة بالامتزاز ، حيث يحدث اعادة توزيع المادة الممتزة بين السائل المذيب وسطح

الجدول (1.12)
بعض المذيبات الشائعة مع بعض من خواصها الفيزياوية

المذيب	الوزن الجزيئي	الكثافة عند 25 مْ	معامل الانكسار	درجة الغليان (مْ)	ثابت الحاجز(العزل) الكهربائي
الماء	18.02	0.9971	1.3329	100	78.54
الميثانول	32.04	0.7866	1.3265	64.7	37.50
أسيتونتريل	41.05	0.7766	1.3416	81.6	37.50
أستالدهيد	44.05	0.7780	1.3311	20.4	21.10
فورماميد	45.04	1.1334	1.4475	210.5	109.00
حامض الفورميك	46.03	1.2141	1.3694	100.6	58.50
الايثانول	46.07	0.7850	1.35[illegible]4	78.3	24.55
الاسيتون	58.05	0.7900	1.3587	56.3	20.70
n- مثيل فورماميد	59.07	0.9988	1.4300	182.5	182.40
حامض الخليك	60.05	1.0492	1.3719	117.9	6.15
1 ـــ بروبانول	60.10	0.8038	1.3856	97.2	20.33
سايكلوبنتان	70.13	0.7454	1.4065	49.3	1.96
بنتان	72.15	0.6262	1.3579	36.1	0.0
خلات المثيل	74.08	0.9342	1.3614	56.3	6.68
1- بيوتانول	74.12	0.8060	1.3973	117.7	17.51
إيثر ثنائي الاثيل	74.12	0.7076	1.3495	34.5	4.34
ثنائي كبريتيد الكربون	76.14	1.2700	1.6319	46.2	2.64
البنزين	78.12	0.8737	1.4979	80.1	2.28
البيريدين	79.10	0.9782	1.5075	115.3	12.40
ثنائي كلورو ميثان	84.93	1.3148	1.4211	39.8	8.93
هكسان	86.16	0.[illegible]48	1.37[illegible]	68.7	1.89
خلات الاثيل	88.11	0.8946	1.3698	77.1	6.02
تولوين	92.14	0.8623	1.4941	110.6	2.38
كلوروفورم	119.38	1.4799	1.4429	61	4.81
رابع كلوريد الكربون	153.82	1.5844	1.4574	76.7	2.24

المسحوق الماص adsorbent . وقوى الامتزاز هذه غالبا ما تنتج عن تكوين روابط هيدروجينية وعن قوى فان دير فال Van der Waals . ويتم هذا النوع من التحليل في انبوبة أو عمود مملؤ بمادة قابلة لامتزاز المواد عليها ومن ثم يوضع خليط المواد (سائل التخمر) المراد فصلها على المادة المالئة للعمود ، ويسمح للمذيب بالمرور على المخلوط . وباختلاف مكونات المخلوط للامتزاز على سطح المادة الماصة المالئة للعمود ، يتم توزيع مكونات المخلوط بين وجهين أحدهما ثابت والاخر متحرك بحيث ان المكون الذي له ميل كبير للامتزاز يتم امتزازه اولا ويتركز في المنطقة العليا من العمود يليه المكون الذي يقل في درجة ميله للامتزاز على نفس المادة المسامية فيتركز في الطبقة التي تلي اسفل المنطقة الاولى وهكذا ، وبالتالي يمكن القول بانه يتم فصل مكونات مخلوط سائل التخمر بشكل طبقات أو مناطق أو حزم كروماتوجرافية . وأخيرا يسمح للمناطق أو الحزم المنفصلة بالازاحة خارج العمود حيث يتم تجميعها كل على حدة . وأحيانا يتم دفع المادة الصلبة المالئة للعمود الى خارجه ثم تقطيع كل منطقة على حدة واذابة المادة الممتزة بمذيب مناسب . لذلك ينبغي العناية باختيار المادة المالئة المناسبة تبعا لنوع المواد المراد فصلها . ومن المواد المالئة هي تلك المبينة ادناه والمرتبة تنازليا تبعا لقوتها الامتزازية :ـ

سليكات الالمنيوم > الفحم الحيواني > الالومنيا المنشطة > الفلورسيل > السليكاجل > اوكسيد الكالسيوم > اوكسيد المغنيسيوم > التالك > النشا > مسحوق السكر .

كما ينبغي العناية باختيار المذيب المناسب للفصل أو خليط من المذيبات اذ تزداد درجة ذوبان المواد الممتزة المحبة للماء في المذيبات المختلفة تبعا لدرجة قطبيتها ، ويمكن ترتيب المذيبات تصاعديا تبعا لقطبيتها كالاتي : ـ

الايثر البترولي < البنزين < رابع كلوريد الكربون < ثالث كلوريد الاثيلين < كلوريد المثلين < الكلوروفورم < حامض الخليك < الاستيون < الكحول البروبيلي العادي < الكحول المثيلي العادي < الماء < البيريدين .

2.12.2. التحليل الكروماتوجرافي بالفصل او التجزيء Partion Chromatography

ويعزى فصل مكونات مخلوط ما بواسطة هذا النوع من التحليل الكروماتوجرافي الى اختلاف ميل هذه المكونات للذوبان في مذيبين غير قابلين للامتزاج مع بعضهما امتزاجا تاما • وفي هذه الحالة يبقى أحد المذيبين ساكنا أو للاصقا أو مغلفا لمادة حاملة مسامية خاملة ليس لها أي قدرة امتزازية ويسمى بالمذيب الساكن أو غير المتحرك immobile solvent بينما يسري المذيب الاخر خلال المادة المسامية ويسمى بالمذيب المتحرك mobile solvent • وكما ذكرنا فان العامل الفعال هنا هو الذوبان النسبي للمذاب بين سائلين غير قابلين للامتزاج وهذا ما يسمى بمعامل الفصل partition coefficient أو نسبة التوزيع distribution ratio ، أي :-

$$\text{معامل الفصل} = \frac{\text{تركيز المذاب في الوجه الثابت}}{\text{تركيز المذاب في الوجه المتحرك}}$$

وفي هذا النوع من التحليل الكروماتوجرافي يمر خليط المراد فصلها بعدة خطوات متكررة من الفصل في الوقت الذي يسري فيه المذيب المتحرك مارا بالمادة المسامية الحاملة ، وينشأ عن اختلاف المواد المذابة في التوزيع بين المذيب المتحرك والمذيب غير المتحرك ان يحدث تركيز او حجز او تراكم المواد التي لها القدرة او الميل الاكبر نحو المذيب غير المتحرك (الوجه الثابت **stationary phase**) في حين المواد التي لها الميل الاكبر نحو المذيب المتحرك (**الوجه المتحرك mobile phase**) نجدها تتحرك معه ، وعلى ذلك تختلف سرعة كل مادة من مكونات **المخلوط اثناء** سريان المذيب المتحرك وتنفصل في حزم او بقع متباعدة باتجاه سريان المذيب المتحرك •

ويمكن اجراء التحليل الكروماتوجرافي بالفصل باحدى طريقتين : الاولى باستخدام عمود يملاء بمادة مالئة مناسبة غير قابلة لامتزاز المواد على سطحها ، اي ان هذا النوع من التحليل يشابه التحليل الكروماتوجرافي بالامتزاز على عمود

من ناحيــة أسلوب أجراء التحليل الا أنه يختلف في الاساس العلمي بعــدم اعتماده على القوة الامتزازية في فصل مكونات المخلوط • ومن المواد المالئــة للعمــود : السليكاجل ومسحوق السليلوز والنشا والتربة الدياتومية وغيرها • كمـا يمكن استخدام نظام متكون من مذيب واحد او نظام متكون من خليط مــن المذيبات • وغالبا يمثل الماء المذيب غير المتحرك وتكون نسبته في معظم النظم بين 10 — 20% من المذيب المتحرك في حين تشكل النسبة الباقية وهي بين 80 — 90% المذيب العضوي او خليط المذيبات العضوية •

وكما ذكرنا فان الخطوات المتبعة في اعداد العمود الكروماتوجرافي وعملية الفصل والازاحة للمكونات المفصولة خارج العمود وغيرها من الخطوات تتشابه مع مثيلتها في حالة التحليل الكروماتوجرافي بالامتزاز ، ولكن في الغالب لا تترك الحزم او المناطق المنفصلة في العمود الكروماتوجرافي بل يتم غسيلها بالطريقة المناسبة لازاحة او استرداد elution كل طبقة وبالتالي يتحصل على مستخلصات جزئية يحتوي كل منها على احدى المواد المراد فصلها ويستخدم لذلك جهاز جامع الاجزاء fraction collector • وتتوقف ازاحة المكونات على الوقت وحجم المحلول ووزنه وعدد القطرات المنسكبة من العمود الكروماتوجرافي •

اما الطريقة الثانية فهي التحليل الكروماتوجرافي بالفصل او التجزيء على الورق paper partition chromatography ، وفي هذا النوع من التحليـل تمثل ورقة الترشيح السليلوزية المادة الحاملة المسامية • وفي كلتا الحالتين يطلق على المادة الحاملة المسامية والمذيب غير المتحرك اسم الوجه الثابت او غير المتحرك في حين يطلق على الجزء الاخر من المذيب والمحتوي على المواد المراد فصلها اسـم الوجه المتحرك • ويتم وضع قطرة صغيرة من مخلوط المواد (سائل التخمر) المراد فصلها على ورقة الترشيح قريبة من احد اطرافها ويسمح لنظام المذيب بالمرور خلالها والانتشار عليها (حيث تكون ورقة الترشيح نفسها مشبعة ببخار الماء) • فيحدث توزيع المكونات المخلوط بين الوجهين كل حسب معامل فصلها او توزيعهـا (بين المــاء الموجـود علـى الـورق وبين المذيب المشـبع بالمــاء) • ونتيجـة لهذا التوزيع تنفصل مكونات المخلوط عن بعضها وعلى مسافات مختلفة تبعا لسرعة

سريانها مع المذيب المتحرك . وبعد انتهاء التحليل يتم التعرف على المكونات المنفصلة في بقع اذا كانت ملونة أو يتم رشها بكاشف reagent مناسب لتلوينها ويمكن الاستدلال عليها من حساب قيم R_f لها أو بأية وسيلة اخرى .

وقيمة R_f-value (اي Relative front) هي عامل حسابي يستخدم للمقارنة بين المواد المنفصلة ويأخذ قيمة ثابتة للمادة عند استخدام نفس النظام من المذيبات ، وهذه القيمة تمثل العلاقة بين مسافة الهجرة للمادة المراد فصلها على ورق الترشيح وبين مسافة الهجرة للمذيب من نفس نقطة الابتداء اي : ــ

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي بلغتها المادة من نقطة الابتداء}}{\text{المسافة التي بلغها المذيب من نقطة الابتداء}}$$

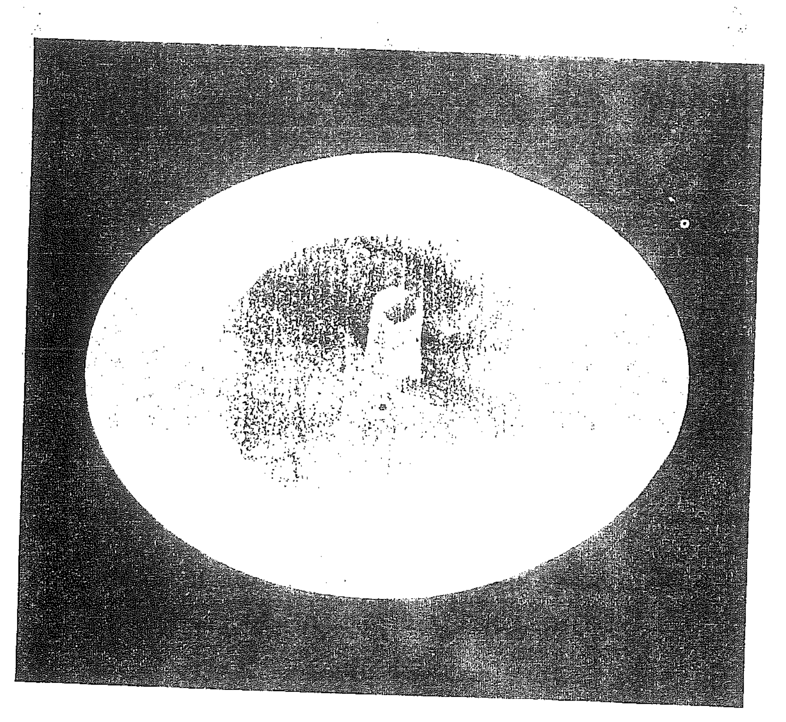
ولما كانت سرعة انتشار أو سريان المذيب أكبر من سرعة انتشار أو سريان المادة المفصولة ، فان قيمة R_f تتميز بكونها دائما كسرا حقيقيا الا في حالات نادرة جدا قد تساوي الواحد الصحيح . ان مدة التحليل وبالتالي قيم R_f المتحصل عليها تختلف حسب نوع الورق المستعمل ونظام المذيب المستخدم ودرجة حرارة التحليل وتركيز محلول مخلوط المكونات المجهولة والاس الهيدروجيني ونوع التحليل الكروموتوجرافي الورقي ، الا انها تعد قيما مميزة لكل مادة يراد فصلها ولا تتغير بتغيير طول ورقة الترشيح .

وهناك طرق عديدة للتحليل الكروموتوجرافي الورقي ، يتوقف اختيار احداها على نوع المركبات المراد فصلها وسهولة اجراء التحليل واخيرا التفضيل الشخصي للقائم بالتحليل . وسنذكر فيما يلي بعضا من هذه الطرق بشيء من الايجاز ويمكن للقارىء أن يعود الى المراجع المتخصصة لمزيد من التفاصيل .

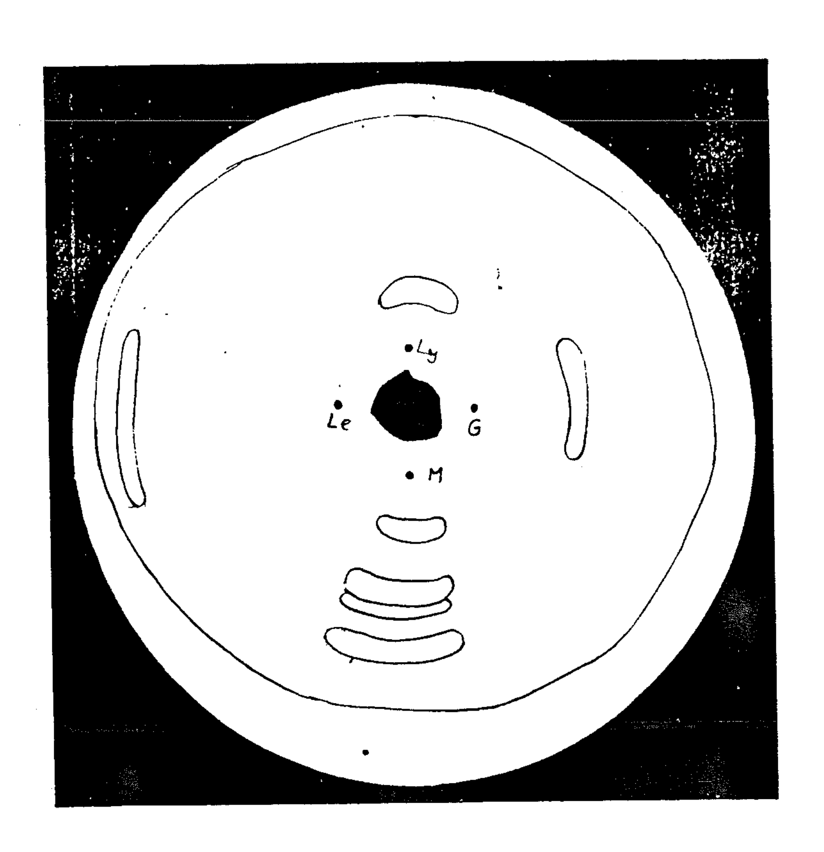
١ ــ التحليل الكروموتوجرافي الورقي الدائري Circular-paper chromatography :

في هذه الطريقة تستخدم ورقة ترشيح دائرية تثقب من الوسط ويوضع فتيل Wick **عموديا على مستوى ورقة الترشيح** . وعند اتصال ورقة الترشيح **بالفتيل توضع قطرة** من المخلوط المجهول على الورقة قرب الفتيل ومن ثم يغمس

الاخير في طبق بتري يحتوي على المذيب المتحرك ليسري خلال ورقة الترشيح عن طريق الفتيل ونتيجة لذلك تنفصل مكونات المخلوط على شكل بقع دائرية كل حسب معامل توزيعه بين الوجهين الثابت والمتحرك ، كما هو مبين في الشكل (12 . 8) والشكل (12 . 9)



الشكل (12 . 8) التحليل الكروماتوجرافي الورقي الدائري

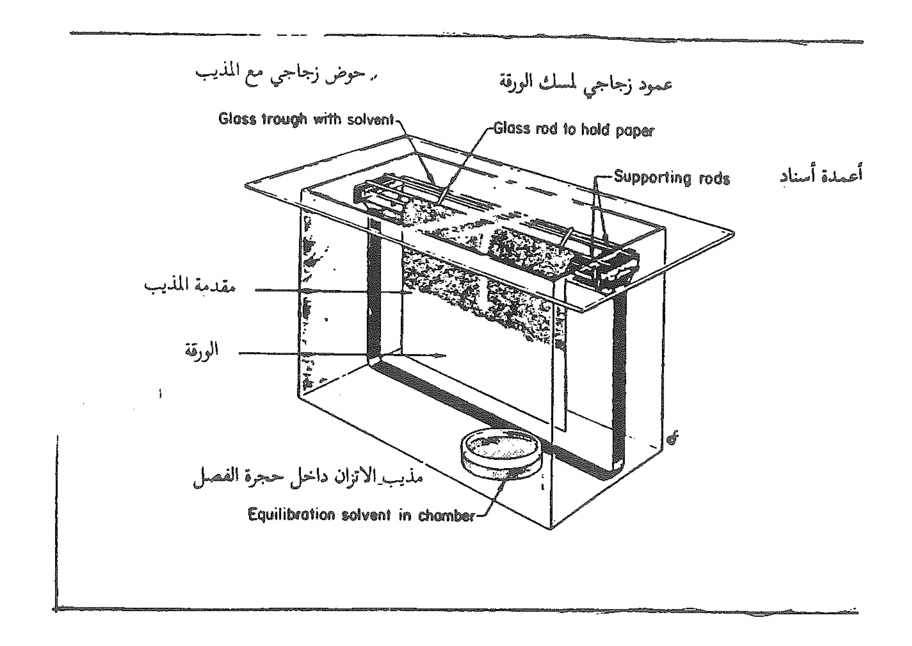


الشكل (12 . 9) كروماتوجرام لاحماض امينية مفصولة بواسطة
التحليل الكروماتوجرافي الورقي الدائري بعد رشها
بمحلول النينهدرين

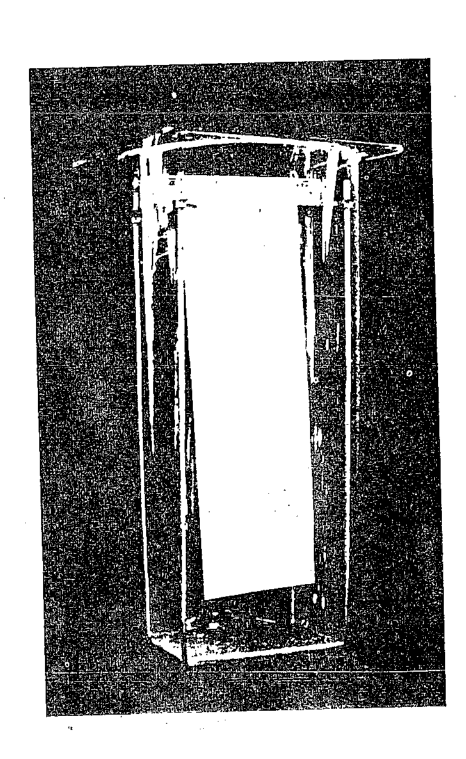
ب ـ التحليل الكروموتوجرافي الورقي بالطريقة النازلة
: Descending paper chromatography

في هذه الطريقة تهاجر مكونات المخلوط المراد فصلها بسرعات مختلفة مع سريان المذيب المتحرك خلال شريط او صحيفة ورق الترشيح من اعلى الى اسفل باتجاه الجاذبية الارضية وبذلك تصبح مكونات المخلوط على ابعاد مختلفة ٠ وتمتاز

ذه الطريقة بسرعة الاجراء لكون سريان المذيب مع اتجاه الجاذبية الارضية وبذلك مكن الحصول على أوضح لمكونات المخلوط ٠ اذ يكون طرف ورقة لكروماتوجرام العلوي مغمورا في حوض المذيب في حين يتدلى جسم الورقة الى لاسفل ، وكما هو مبين في الشكل(12 . 10) والشكل (12 . 11)



الشكل (12 . 10) التحليل الكروماتوجرافي الورقي بالطريقة النازلة

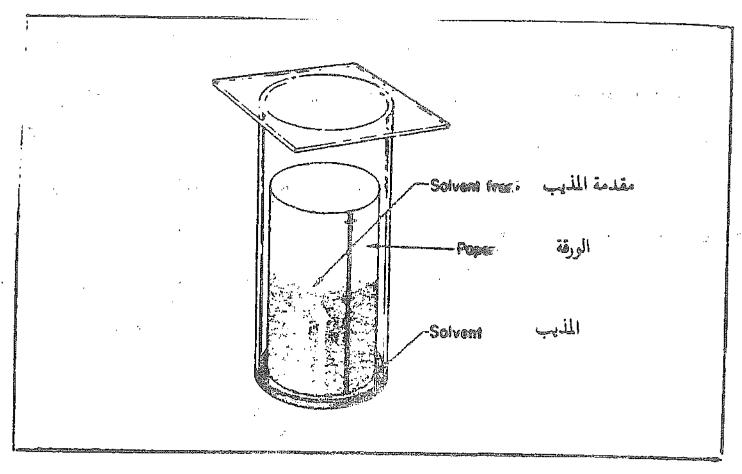


الشكل (12 . 11) التحليل الكروماتوجرافي الورقي بالطريقة النازلة

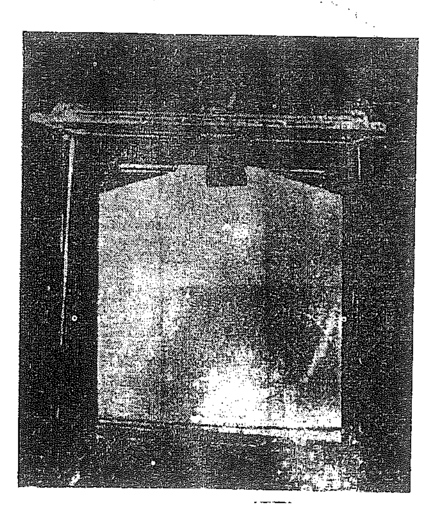
جـ ـ التحليل الكروموتوجرافي الورقي بالطريقة الصاعدة
Ascending paper chromatography :

وفي هذه الطريقة تهاجر مكونات المخلوط المراد فصلها مع سريان المذيب المتحرك خلال ورقة الترشيح من اسفل الى اعلى باتجاه معاكس الجاذبية الارضية ٠ اذ يوضع المذيب الصاعد في قاع حجرة الفصل الكروماتوجرافي وتعلق ورقة الترشيح من اعلى بمشابك بحيث يكون طرفها القريب من مكان وضع المخلوط المجهول مغمورا بالمذيب ٠ واحيانا قد تلف ورقة الترشيح على هيئة اسطوانة ويتم تثبيت ذلك بواسطة دبابيس من الصلب غير القابل للصدأ او من البلاستيك ومن ثم يغمس طرف الاسطوانة القريب من مكان وضع المخلوط في المذيب الصاعد ٠ وتمتاز هذه الطريقة بالسهولة الا انها تستغرق وقتا طويلا فضلا عن ان فصل بعض مخاليط لايكون جيدا

داخل بقع المكونات المنفصلة على الكروماتوجرام بعضها ببعض ، كما هو موضح في الشكل (12 . 12) والشكل (12 . 13) .



الشكل (12 . 12) التحليل الكروماتوجرافي الورقي بالطريقة الصاعدة
(الورقة ملفوفة على هيئة اسطوانة)

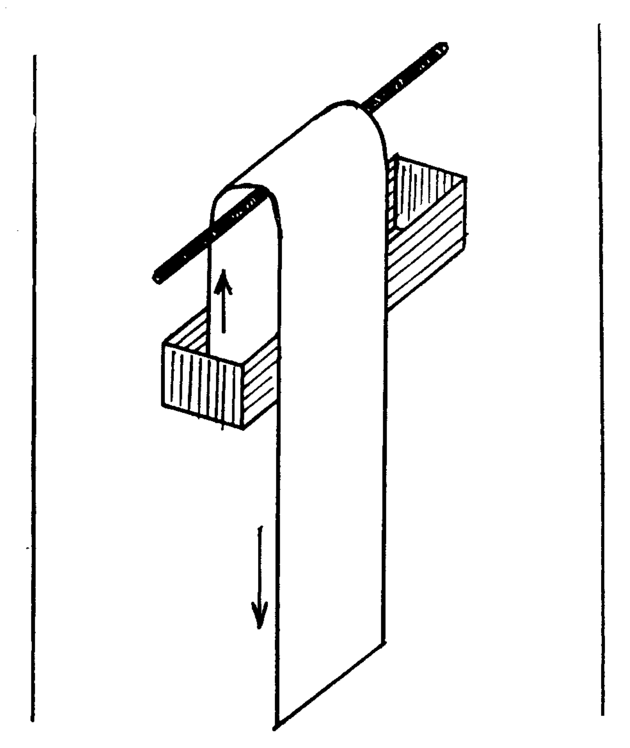


الشكل (12 . 13) التحليل الكروماتوجرافي الورقي بالطريقة الصاعدة
(الورقة على هيئة منبسطة)

د ـ التحليل الكروماتوجرافي بالطريقة الصاعدة النازلة

Ascending-descending paper chromatography

وهذه الطريقة تجمع بين مميزات الطريقة الصاعدة والنازلة ، اذ تعلق ورقة الترشيح على ساق زجاجية بحيث يتدلى طرفاها من الجانبين كما هو موضح في الشكل (12 . 14)ويغمس طرف الورقة المتدلي والقريب من مكان وضع المخلوط في حوض المذيب الصاعد ويسمح له بالسريان عكس اتجاه الجاذبية الارضية ساحبا معه مكونات المخلوط بسرعات متقارنة وعند الوصول الى الساق الزجاجية يتحول سريان المذيب ليصبح باتجاه الجاذبية الارضية (اي من اعلى الى اسفل) حتى نهاية التحليل ٠

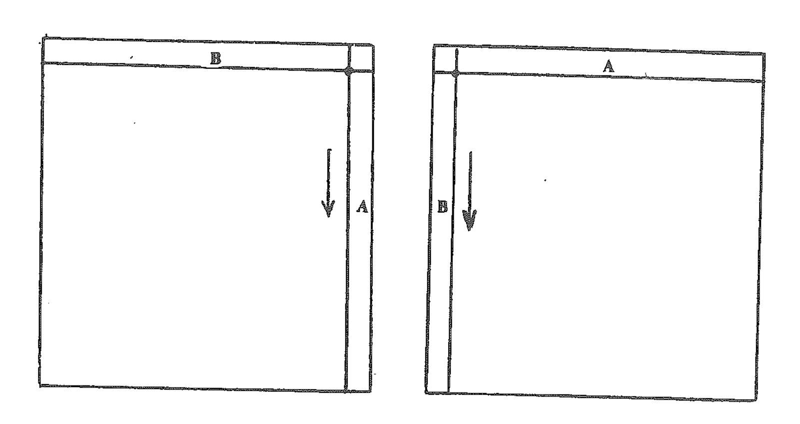


الشكل (12 . 14)رسم تخطيطي لاسلوب التحليل الكروماتوجرافي الورقي بالطريقة الصاعدة النازلة ٠

هـ ـ التحليل الكروماتوجرافي الورقي ذو الاتجاهين

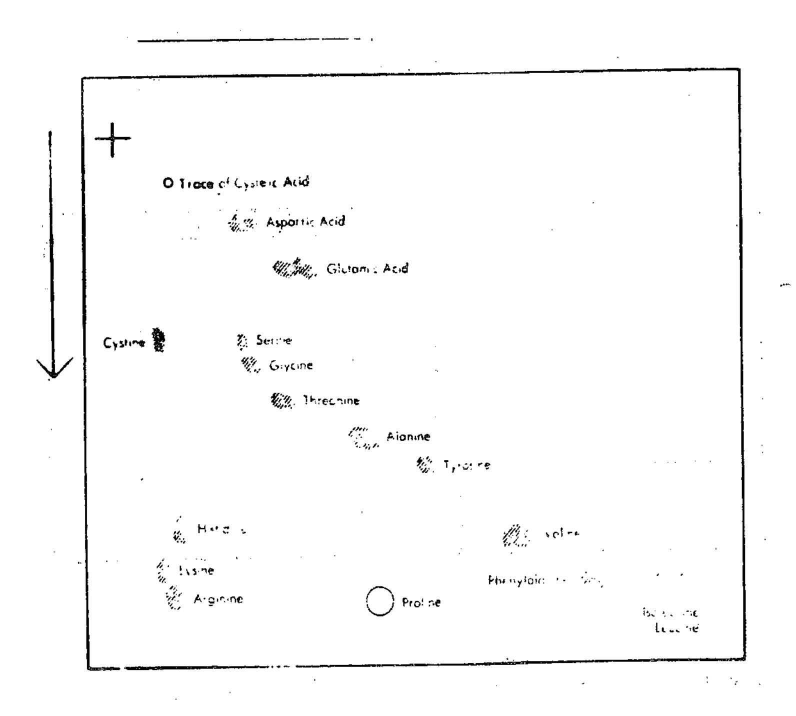
: Two-dimensional paper chromatography

وفي هذه الطريقة يتم الفصل الكروماتوجرافي باتجاهين متعامدين على نفس ورقة الترشيح وبنفس قطرة المخلوط المراد فصل مكوناته ٠ وتستخدم هذه الطريقة للحصول على فصل اوضح وادق لمكونات المخلوط (سائل التخمر) والتي لا يمكن فصلها بهذه الدرجة من الدقة عند اتباع الطرق السابقة ٠



وتجهز ورقة الفصل الكروماتوجرافي برسم خطين للابتداء base line متعامدين مع بعضهما وتوضع قطرة المخلوط في مركز تقاطع الخطين المتعامدين ٠ ويجري التحليل باحدى الطريقتين السابقتين الصاعدة او النازلة ٠ وبعد انتهاء التحليل وجفاف الورقة تدار بزاوية مقدارها 90^o اي تصبح بوضع متعامد مع الوضع السابق ويعاد اجراء التحليل بنفس طريقة اجرائه في الوضع السابق ٠ وقد يستخدم نفس نظام المذيب في كلا التحليلين ، او يستخدم نظام مذيب في التحليل الاولى ومن ثم يستبدل بنظام مذيب اخر في التحليل الثاني ٠ وفي كلا التحليلين يحدث فصل أو تجزيء أو توزيع لمكونات المخلوط (سائل التخمر) ، حيث تصطف المكونات طوليا بعد انتهاء التحليل الاول في حين تنتشر على جميع

انحاء ورقة الترشيح (الكروماتوجرام) بعد انتهاء التحليل الثاني ، وكما هو موضح في الشكل (12 . 15) •



الشكل (12 . 15) كروماتوجرام للتحليل الكروماتوجرافي في الورقي ذو الاتجاهين (فصل مخلوط لسبعة عشر حامضا امينيا)

و ــ التحليل الكروماتوجرافي الورقي ذو الاتجاه الواحد والمتعدد الاظهار او التحميض

— : Unidimensional multiple development paper chromatography

وفي هذه الطريقة يتم الفصل الكروماتوجرافي باتجاه واحد ولكن بعدد اكبر من عمليات الاظهار أو التحميض ، حيث تعطى الفرصة لمكونات المخلوط المراد فصلها للحركة مع المذيب لمسافات طويلة أطول من المسافة التي يتحركها المذيب في حالة الاظهار الواحد ، ونتيجة لذلك يتم الحصول على فصل دقيق وواضح لمكونات المخلوط مقارنة بحالة الاظهار الواحد ٠ ويمكن اجراء التحليل بأي من الطريقتين الصاعدة او النازلة ولكن في أكثر الاحيان تفضل الطريقة النازلة لانها أسرع وتسمح بتكرار عملية الاظهار لاكثر من مرة ٠ ويتبع في اجراء هذا التحليل نفس الخطوات المتبعة في الطريقة النازلة ويمكن تلخيصها في الاتي :ــ

(1) يرسم خط الابتداء Base line وخط الوصول أو الانتهاء Solvent front على ورقة الترشيح ومن ثم تقطع ورقة الترشيح على هيئة متعرجة (زكزاك) وعلى مسافة 2 ــ 3 سم من خط الانتهاء وذلك لتنظيم تساقط المذيب المتحرك النازل بسهولة وبصورة عمودية ٠

(2) توضع قطرة من دليل ملون بحيث تكون هجرتها خلال التحليل اسرع قليلا من من سرعة حركة أسرع مكون في المخلوط المراد فصل مكوناته وذلك لتلافي فقد هذا المكون خلال التحليل ٠

(3) يجري الاظهار ويصل المذيب المتحرك الى خط الانتهاء ويسمح له بالتساقط من طرف الورقة لغاية ان تصل بقعة الدليل اللوني الى مسافة 10 سم من خط الانتهاء ٠

(4) يرفع الكروماتوجرام ويجفف ويعاد الاظهار من جديد ، وتستمر العملية لعدة مرات حتى تصل بقعة الدليل اللوني الى خط الانتهاء ، وعندها يرفع الكروماتوجرام ويجفف ويجهز لعملية التعرف على المكونات المنفصلة ٠

ز ــ التحليل الكروماتوجرافي الورقي بالطريقة المعكوسة (المقلوبة)

— : Reversed-Inversed paper chromatography

يمكن استخدام أي من طرق التحليل الكروماتوجرافي السابق وصفها لتحقيق الفصل الكروماتوجرافي باستخدام مذيب عضوي (أو مخلوط) مشبع بالماء ٠ الا

أنه وجد في حالة المركبات القابلة للذوبان في الماء ان وجود الماء في مخلوط المذيبات لا يحقق الفصل الكروماتوجرافي الجيد ولذلك لا بد من معاملة الورقة بما يغير من خاصيتها القطبية • ويتم ذلك بتندية ورقة الترشيح بواسطة الفازلين أو البارافين أو السليكون أو المطاط ، وبذلك تصبح خاصيتها القطبية أقل ، وبالتالي يصبح كالكحول البيوتيلي العادي هو الوجه غير المتحرك في حين يصبح المذيب القطبي كالماء هو الوجه المتحرك • ومن هنا جاءت هذه التسمية « الطريقة المعكوسة » اذ أمكن بواسطتها فصل مكونات مخاليط عدد من المواد غير القابلة للذوبان في الماء •

وبغض النظر عن الطريقة المتبعة في التحليل الكروماتوجرافي ، فانه عـادة يتم التعرف على البقع المنفصلة كما يلي :ــ

أ) اذا كانت البقع ملونة ، فعند ذاك يسهل رؤيتها والتعـرف على مكانها على الكروماتواجرام •

ب) واذا كانت البقع غير ملونة ، فيستلزم الامر معاملتها بطرق مختلفة مناسبة كما يلي :ــ

(1) يغمس الكروماتوجرام في محاليل مناسبة بشرط عدم ذوبان مكونات البقعة المنفصلة في المحلول الكاشف • وبعد ذلك يرفع الكروماتوجرام ويجفف لكي تظهر بقع المواد المنفصلة •

(2) غالبا ما يلجـأ الى رش الكروماتوجرام لاظهار البقع بعـد انفصـالها وذلك بواسطة رشاشات صغيرة (المجزيء Atomizer) •

(3) ويلجأ أحيانا الى تعريض الكروماتوجرام الى الاشعة فوق البنفسجية ، أو قد يعامل الكروماتوجرام قبل التعريض للاشعة بمحاليل معينة من شأنها ان تظهر المواد المختبرة بالوان مميزة تحت الاشعة فوق البنفسجية •

(4) يمكن تعريض الكروماتوجرام المحتوي على البقع المنفصلة الى جهاز التحليل البولاروجرافي (الاستقطاب الكهربائي) وذلك في حالة المواد التي تبدي استجابة لهذا النوع من التحليل •

(5) اذا كانت المواد المنفصلة على الكروماتوجرام ذات نشاط اشعاعي فمن الممكن التعرف عليها بعدة وسائل لقياس هذا النشاط الاشعاعي •

(6) ويمكن وضــع الكروماتوجرام المحتــوي على مواد منفصلة نشطة بايولوجيا كالمضادات الحيوية لفترة قصيرة على سطح طبق بتري يحتوي على آجار غير ملقح ٠ وبعــد فتـــرة ستنتشر المــادة النشــطة من مــكان وجودها على الكروماتوجرام الى الاجار الذي تحتها ومن ثم يرفع الكروماتوجرام ويحضن الطبق ، ويمكن اجراء الفحص البايولوجي لهذه المادة المنفصلة مثل كونها مثبطة لنمو أحياء مجهرية معينة ٠

(7) تقــارن قيم R_f للبقع المنفصلة بنظيراتها القياسية من المادة النقيــة التي توضــع على نفس الكروماتوجرام وتفصــل مع المكونات المجهــولة للمخلوط تحت نفس الظروف التحليلية ٠ فاذا أظهرت نواتج التخمر والمركبات القياسية النقية قيم R_f متماثلة فهذا يعني أن كليهما مادة كيمياوية واحدة ٠

والمواد المنفصلة كروماتوجرافيا والتي تم التعرف عليها وصفيا يمكن تقديرها كميا بعدد من الطرق وذلك بعد استردادها من على الكروماتوجرام واذابتها فــي محاليل مناسبة تساعد في الكشف عن خاصية معينة ٠ اذ يمكن تقدير المواد المنفصلة لونيا في مدى الضوء المنظور ومقارنتها بعينة قياسية معروفة التركيز أو التقدير المرتبط بخاصية كهربائية معينة مثل فرق الجهد ومقارنتها بعينة قياسية ، أو بطرق عديدة أخرى قد تكون بعيدة عن هدف هذا الكتاب ٠

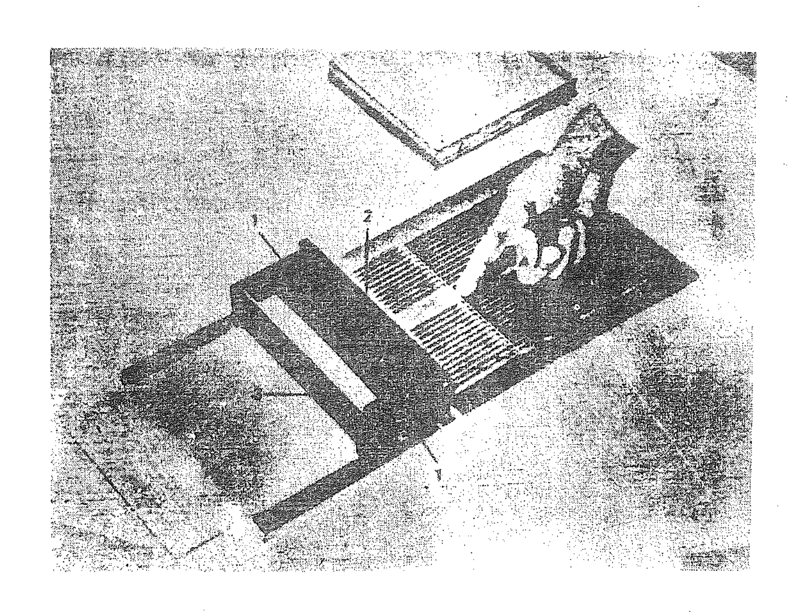
3.12.2. التحليل الكروماتوجرافي بالطبقة الرقيقة Thin-Layer Chromatoperaphy

تعد طريقة التحليل بالطبقة الرقيقة احدى الطرق المستحدثة وتقع حساسيتها بين طــرق التحليــل الكروماتوجرافي الورقــي وطــرق التحليل الكروماتوجرافي الغازي ٠ ويتشابه هذا النوع من التحليل مع التحليل الكروماتوجرافي الورقي بأنه يستخدم في التحليل الوصفي والتقدير الكمي لخاليط المواد المراد فصلها ولكنــه يتميز عنه بكونه يعطي فصــلا واضــحا لكميات ضئيلة جــدا من النموذج وكذلك يستغرق وقتا قصيرا وخطوات قليلة ، كما انه يستبدل الورق بطبقة رقيقة من مادة مسامية محمولة على لوح زجاجي ٠

ان القوى المسئولة عن الفصل في هذا النوع من التحليل الكهروماتوجرافي هي القوى الخاصة بالامتزاز على السطح الصلب • ويتم هذا التحليل على شرائح أو ألواح من الزجاج تكسى بطبقة من المادة المسامية الصلبة • ومن المواد الامتزازية الشائعة الاستخدام السليكاجل وأوكسيد الالمنيوم (الالومنيا) أو أي مادة أخرى • ويخلط عادة مع كل منهما مادة رابطة Bining agent مثل كبريتات الكالسيوم $VaYO_3$ (الجبس) أو النشا اذ تضيف الى المادة الماصة قوة وتعطي اللوح الزجاجي ثباتا ميكانيكيا • وقد يكون للمادة الماصة adsorbent وميض فلوري وعليه فان البقع المنفصلة تظهر سوداء اللون بالنسبة للخلفية الفلورية للوح الزجاجي عندما يعرض للاشعة فوق البنفسجية • وفي بعض الاحيان يمكن أن يصبح نظام السليكاجل معتمدا على اساس الفصل partition وليس الامتزاز وخاصة اذا كان مستوى قطبية نظام المذيب عاليا •

وفي تحضير اللوح الزجاجي تعمل عجينة من المادة الماصة مع الماء ثم تصب في جهاز خاص يستطيع عمل فيلم (غشاء) رقيق من المادة الصلبة على سطح اللوح الزجاج وبسمك معين (وعادة بين 300 — 500 مايكروميتر) كما هو موضح في الشكل (16.12) • وبعد ذلك تجفف الالواح في فرن على درجة حرارة 216 م ولمدة ساعة واحدة وذلك لتنشيط المادة الحاملة (أو بمعنى اخر لازالة معظم الماء منها) • وعندما يراد فصل المركبات غير القطبية ، تعامل المذيبات معاملة خاصة كي تكون خالية من الماء وبالتالي فان عملية تنشيط السليكاجل تجرى على درجات حرارة أعلى (حوالي 150 م ولمدة 3 ساعات) بعد ذلك تكون الالواح جاهزة لعملية التحليل الكروماتوجرافي •

وقد يجرى تركيز لمحلول النموذج التخمري قبل وضعه على اللوح بحيث يمكن وضع اكبر تركيز منه في أقل حجم ممكن من اللوح ، وتستخدم لهذا الفرض ماصة دقيقة كما يتم وضع قطرة من المادة او المواد القياسية النقية لتكون بمثابة مرشد عن المكونات المفصولة في النموذج المجهول • ويتوقف نجاح العملية على اختيار المذيب المناسب للفصل ، اذ تتوقف عملية الفصل نفسها على الاعتبارات الخاصة بالقطبية النسبية للمركبات المراد فصلها اضافة الى الاعتبارات الخاصة بدرجة القطبية المطلوب توفرها في نظام المذيب لاعطائه الحركة المناسبة لعملية الفصل •

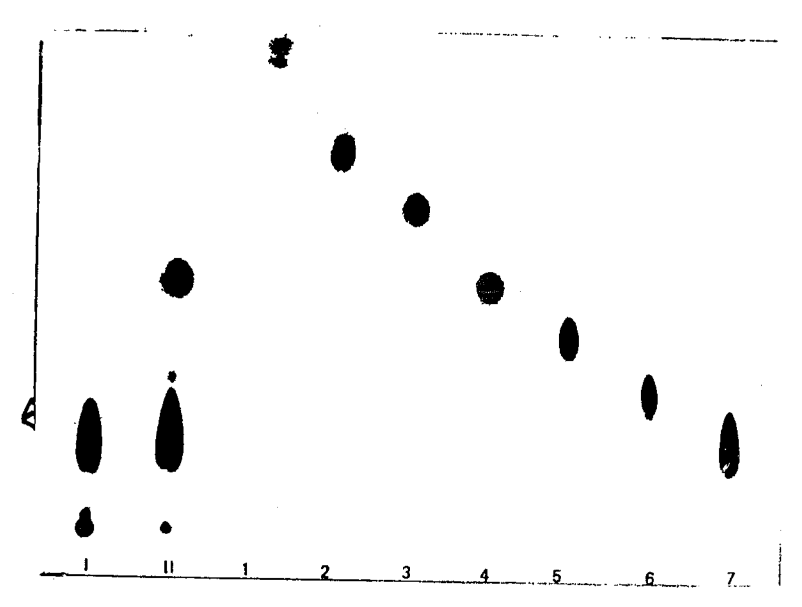


الشكل (16.12) جهاز بسط عجينة المادة الماصة على الالواح الزجاجية لعمل طبقة رقيقة (TLC—Applicator)
(حيث : 1 = الجدران الجانبية ، 2 = باب الدخول 3 = باب الخروج)

وعادة ما تجري عملية الفصل الكروماتوجرافي على اللوح بالطريقة الصاعدة ٠ وبعد انتهاء التحليل يحدد خط الانتهاء وتجفف الالواح ليتم التعرف على البقع المنفصلة ٠ فاذا كانت البقع ملونة او ذات وميض فلوري فانه يسهل التعرف عليها ٠ اما اذا كانت غير ملونة فيمكن معاملتها باحدى الكواشف المناسب لاظهار البقع بصورة واضحة ومن ثم يمكن معرفة قيم R_f لمكونات المخلوط المجهول ومقارنتها

بقيم R_f للمركبات القياسية النقية كما سبق ذكره في حالة التحليل الكروماتوجرافي الورقي ، الشكل (12 . 17) ٠

وحال التعرف على البقع المنفصلة تظهر عدة اختيارات للتقدير الكمي منها : ازالة البقعة scraping off من على المادة الحاملة واستردادها بمذيب مناسب ويعقب ذلك تقديرها بطريقة التحليل اللوني او التحليل الطيفي او باية وسيلة تحليله أخرى ، أو يمكن قياس شدة البقعة بواسطة جهاز مسح ضوئي photometric scanner سواء كان ذلك للبقع المرئية او المتفلورة (المنيرة) ٠



الشكل (12 . 17) كروماتوجرام للتحليل الكروماتوجرافي بالطبقة الرقيقة TLC

بعد عملية الكشف عن المكونات المفصولة باستخدام احد المحاليل الكاشفة ٠

(الكروماتوجرام لنماذج من الليبيدات المتعادلة حيث : I , II = نماذج مجهولة مجهولة يراد التعرف على مكوناتها ، 1 — 7 = نماذج قياسية نقية من الليبيدات)

2 . 12 . 4 التحليل الكروماتوجرافي الغازي Gas chromatography

تعد طريقة التحليل الكروماتوجرافي الغازي من احدث وسائل التحليل التي يتم بها التعرف على مكونات المخاليط وتقدير كميات متناهية في الصغر من هذه المكونات ، وتزيد حساسية هذه الطريقة والتي تكون بحدود 1×10^{-12} غرام بزيادة الاهتمام بتحسين الاعمدة الكروماتوجرافية وايجاد مكتشفات Detectors حساسة ٠

ويمكن ان يحدث التحليل الكروماتوجرافي الغازي بطريقتين : —

الاولى — ويكون التحليل فيها بين وجهين احدهما ثابت وهو الوجه السائل المغلف لمادة صلبة والاخر هو الوجه المتحرك وهذا عبارة عن غاز خامل ويسمى التحليل في هذه الحالة بالتحليل الكروماتوجرافي الغاز — السائل Gas Liquid Chromatography (GLC) او يسمى بالتحليل الكروماتوجرافي الغازي التجزيئي Gas Liquid Partition Chromatography نتيجة لاستخدام السائل كوجه انتشار (وجه ثابت) ٠

الثانية — ويكون التحليل بين وجهين احدهما ثابت وهو المادة الصلبة المالئة للعمود الكروماتوجرافي والاخر الوجه المتحرك وهو الغاز الخامل ويسمى التحليل في هذه الحالة بالتحليل الكروماتوجرافي الغاز — الصلب Gas Solid Chromatography (GSC) او يسمى بالتحليل الكروماتوجرافي الغازي الامتزازي Gas Adsorption Chromatography نتيجة لاستخدام المادة الصلبة كوجه انتشار (وجه ثابت) ٠

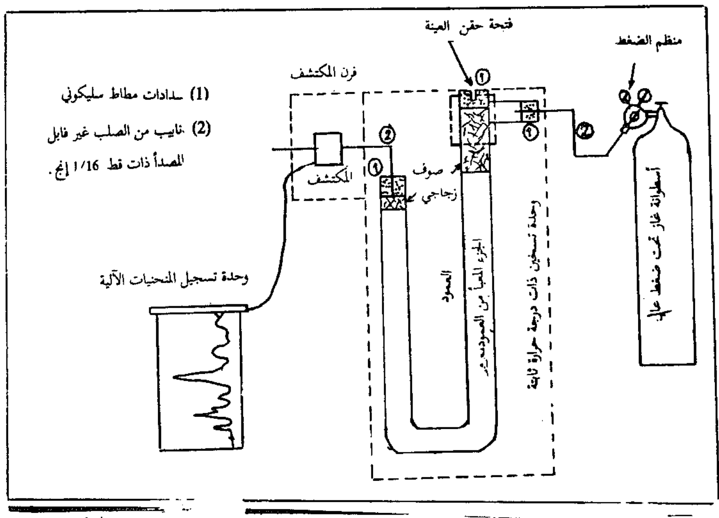
ويعد التحليل الكروماتوجرافي الغاز — السائل التجزيئي GLC الاكثر شيوعا ٠ وان الوجه المتحرك هو الغاز في حين ان الوجه الناشر (الثابت) عبارة عن سائل غير متطاير يغلف مادة صلبة خاملة ٠ ويتم اظهار او تحميض الكروماتوجرام بطريقة الازاحة Displacement ، حيث يتم فصل مكونات النموذج حسب معاملات توزيعها بين الوجهين ، وكل مكون يهاجر خلال العمود بمعدل يعتمد على التفاوت في درجة تطايره وكذلك على مدى ارتباطه بالوجه السائل (الثابت) ٠ ويتم تبخير مكونات المخلوط المراد فصلها بحيث يكون لكل مكون منها سرعة مستقلة في اعادة ظهورها مرة اخرى على صورة ابخرة تحمل مع

تيار الغاز المتحرك باستمرار ، اي انه يمكن استخدام الوجه السائل وطول العمود المناسبين في فصل ابخرة المخلوط الى مكوناتها بحيث يحمل تيار الغاز المتحرك ابخرة كل مكون بمفرده الى المكتشف الالكتروني الذي يتم به التسجيل الكمي للكميات التي تصله من كل مكون حسب خصائص جزئياته • وتصمم المكتشفات الالكترونيـــة Detectors على أسس من صفات معينة مثل الكثافة والتوصيل الحراري وحرارة الاحتراق والتأين وغير ذلك من الخواص التي تتأثر بوجود المادة التي يتم تقديرها ونتيجة هذا التاثير تتغير هذه الخاصية فيقوم المسجل Recorder بتسجيلها •

وتتألف معظم اجهزة التحليل الكروماتوجرافي الغاز ـ السائل من ستة اجزاء رئيسة هي : ـ

1 . منظومة الضغط ووحدة قياس معدل سريان الغاز Pressure Regulator & Gas Flowmeter
2 . نظام حقن العينة Sample Injecton System
3 . عمود الفصل Separation Column
4 . وحدة التسخين Thermal Unit
5 . منظومة الاستجابة (المكتشف) Detection System
6 . وحدة تسجيل المنحنيات (المسجل) Recorder

ويوضح الشكل (18.12) رسما تخطيطيا لجهاز من هذا النوع •



الشكل (18.12) رسم تخطيطي لجهاز التحليل الكروموجرافي الغازي •

وفيما يلي خطوات اجراء التحليل باختصار : ـ

(1) تجري تجارب اولية لمعرفة النظام الحراري المناسب للتحليل ومعدل سريان الغاز واخيرا الضغط المناسب له ٠

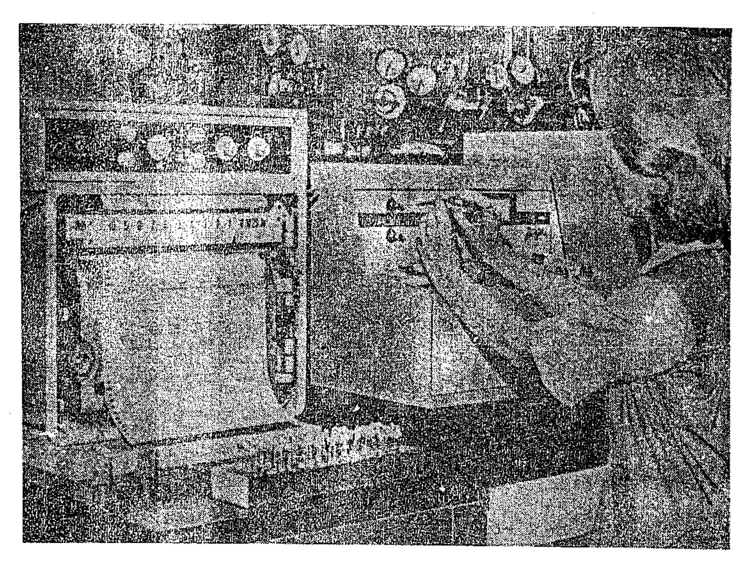
(2) يؤهل الجهاز على درجة حرارة ومعدل سريان الغاز وذلك بتشغيله تحت ظروف التحليل ولكن دون حقن النموذج المراد تحليله لكي يتم التخلص من اي تاثيرات لا ترجع الى المادة المراد تحليلها ٠

(3) يؤخذ قدر معين من النموذج (سائل او ناتج التخمر) مذابا في مذيب عضوي مناسب ويتم حقنه بواسطة محقن خاص وبسرعة تحت صمام مطاطي يقع في مسار تيار الغاز الخامل المتحرك (سواء كان غاز الهيدروجين او الهيليوم او النتروجين أو الارجون) ويسمى الصمام باب دخول النموذج ، وكما مبين في الشكل (19.12) ٠

(4) يحمل تيار الغاز النموذج الى عمود التوزيع التجزيئي الذي يكون مسخنا الى درجة حرارة عالية ٠

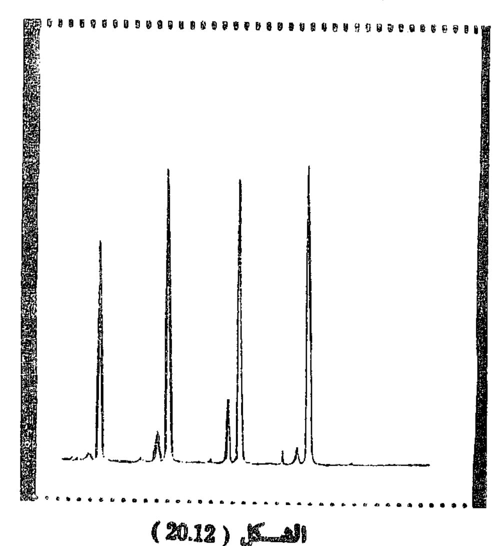
(5) وباستمرار مرور الغاز خلال عمود التوزيع تبدأ اكثر المواد تطايرا في الخروج من العمود محمولة في تيار الغاز الى المكتشف الالكتروني تليها المادة الاقل تطايرا وهكذا ٠ ويحدث في المكتشف استجابة لابخرة المواد المنفصلة تسجل على هيئة منحنيات بواسطة المسجل ، بحيث يكون زمن تسجيل المنحني دالة لنوع المادة المنفصلة ومن الازمنة المختلفة الخاصة بالمنحنيات يمكن التعرف وصفيا على المواد المنفصلة في مخلوط منها ٠ ويعد ارتفاع كل منحني وبدرجة ادق المساحة الواقعة تحت كل منحني ، دالة لكمية المادة وتستخدم هذه الارتفاعات او المساحات في التقدير الكمي للمواد المنفصلة والتي عددها يساوي عدد الذروات التي تم تسجيلها (الشكل (20.12) .

(6) يتم وبنفس الطريقة عمل كروماتوجرامات غازية وتحت نفس ظروف التشغيل لنماذج قياسية من المادة النقية ومن ثم تقارن بالكروماتوجرامات للمواد المحتمل وجودها في المخلوط المجهول وبالتالي يمكن التعرف على هذا المواد وصفيا كما يمكن تقديرها كميا ٠



الشـكل (19.12)

عملية حقن عينة نواتج التخمر في جهاز التحليل الكروماتوجرافي الغازي ، وتظهر الورقة الخارجة من المسجل منحنيات المواد المنفصلة ٠



الشـكل (20.12)

كروماتوجرام غازي لنواتج التخمر المفصولة بالتحليل الكروماتوجرافي الغازي ٠

٤ . 12 . 5 . التحليل الكروماتوجرافي السائل Liquid Chromatography

يعد الكروماتوجرافي السائلي LC من الطرق الحديثة السريعة ذات الدقة العالية التي شاع استعمالها في أواخر السبعينات ۰ ولعل من الضروري ان نذكر بأن هناك نوعين رئيسيين من الكروماتوجرافي السائـل ينتصان بال HPLC ۰ الاول هو الكروماتوجـرافي السائـل العـالي الكفـاءة High Performance Liquid Chromatography ، والثـاني هو الكروماتوجرافي السائـل العـالي الضغط High Pressure Liquid Chromatography ۰ ويكمن الاختلاف بين الاثنين في مقدار الضغط المستخدم في العمود ، حيث يبلغ الضغط في الاول ما يقارب 35 كغم/سم^2 بينما يبلغ في الثاني 350 كغم/سم^2 ۰ ويكاد يكون ال HPLC ملائما لفصل جميع أنواع المركبات تقريبا وذلك لتعدد أنواع الاعمدة المتوفـرة والمستخدمة في الفصل ۰ اذ يمكن ان يتم الفصل على أساس واحد أو أكثـر من ميكانيكيات الفصل التالية :

1 . الامتزاز Adsorption
2 . التجزيء Partition
3 . التبادل الايوني Ion-Exchange
4 . الرفض أو الابعاد Exclusion

ان هذا التنوع والتعدد في أسس الفصل جعلت من الكروماتوجرافي السائل يفوق في انتشار استعماله الكروماتوجرافي الغازي السائل GLC الذي تنحصر فائدته في فصل المركبات المتطايرة ۰

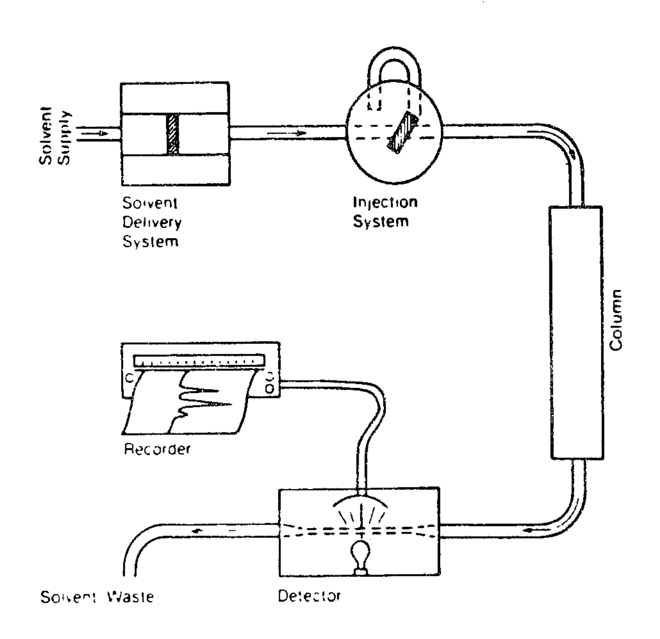
ويتالف جهاز ال HPLC من الوحدات الرئيسة التالية والموضحة في الشكل (21.12) :

1 . منظومة توزيع المذيب Solvent Delivery System — وتتصـل هـذه المنظومة بمستودع المذيب وتقوم بدفع المذيب خلال العمود بالضغط المطلوب ۰

2 . منظومة حقـن العينـة Sample Injection System — وهـذه تستخدم في حقن العينة تمهيدا لدخولها الى العمود محمولة بواسطة المذيب القـادم من منظومة توزيع المذيب ۰

3 . عمود الفصل Separation Column — ويحتوي العمود على مواد مالئة صلدة أو مسامية من مشتقات الكروموسورب Chromosorb حيث يمر خلالها المذيب والعينة المراد فصل مكوناتها .

4 . منظومة الاستجابة (المكتشف) Detection System ـ وهذه تتركب من خلية يمر خلالها المذيب القادم من العمود وتتصل خلية العينة بجهاز تسجيل (مسجل) Recorder . وحاليا يوجد عدد من المكتشفات تتفاوت في صفاتها ومجالات استعمالها ، ويدرج الجدول (21.12) ملخصا لهذه المكتشفات . وكذلك فانه بالامكان جمع الاجزاء fractions الخارجة من منظومة المكتشف لاسترجاع المركب أو المركبات المراد فصلها أو تقديرها بصورة نقية .



الشكل (2.12) . رسم تخطيطي لجهاز التحليل الكروماتوجرافي السائل

الجدول (12-21)

انواع المكتشفات المستخدمة في الـ HPLC مع بعض خصائصها المميزة

نوع المكتشف (تبعاً للخاصية التي يقوم عليها)	الحساسية (غم/ مل)	التخصص	حجم الخلية (ميكروليتر)
1- مكتشف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية UV Absorbance Detector	5×10^{-10}	متخصص	8
2- مكتشف معامل الانكسار Refractive Index Detector	5×10^{-7}	عام	3
3- مكتشف امتصاص الموجات المختلفة الاطوال Variable-Wavelength Absorbence Detector	5×10^{-9}	متخصص	8
4- مكتشف الوميض Fluorescence Detector	اقل من 10^{-9}	متخصص جداً	10
5- مكتشف التأين باللهب Flame Ionization Detector	10^{18} غم/ ثانية	عام	—
6- مكتشف التوصيل Conductivity Detector	10^{-8}	متخصص في الجزيئات المشحونة	1.5

13.2. التبادل الايوني Ion exchanger

قد يعد هذا التحليل نوعا من التحليل الكروماتوجرافي بالامتزاز ، الا انه في حالة الاخير وكما سبق توضيحه تكون القوى الرابطة السطحية الامتزازية ، وهي قوى طبيعية غير قادرة على حمل الشحنات ، هي المسئولة عن عملية الفصل الكروماتوجرافي · بينما في حالة التحليل بتبادل الايونات تكون القوى الكهروكيمياوية electrochemical ، وهي قوى قادرة على حمل الشحنات ، هي المسئولة عن الفصل اذ تتأثر بالعوامل الكيمياوية كالحموضة والقلوية مقدرة في صورة أس هيدروجيني ·

ويعرف التحليل بتبادل الايونات بانه تفاعل الكتروستاتيكي بين الايونات الموجودة في المحلول وبين الايونات الموجودة على سطح المبادل الايوني ·
لذلك يشترط ان يكون التبادل بين الايونات المتشابهة ، بمعنى ان التبادل يحدث بين كاتيونات مخلوط المواد المراد فصلها على مواد تبادل (راتنجات Resins) تحمل الشحنة الموجبة ، وايضا لانيونات المخلوط على مواد تبادل تحمل الشحنة السالبة ·

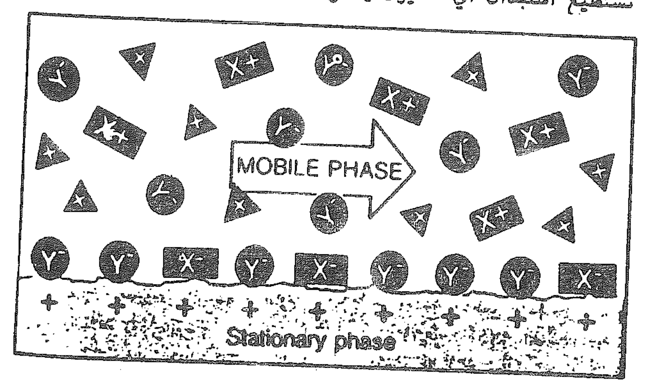
وتتم عملية الفصل بتبادل الايونات في اعمدة ، فهو بذلك مشابه للتحليل الكروماتوجرافي بالامتزاز في اسلوب العمل مع بعض الاختلافات وخصوصا فيما يتعلق بنوع المادة الحاملة او المالئة للعمود · والمبادل الايوني Ion exchanger عبارة عن جزئي كبير متعدد الالكتروليت غير ذائب في الماء يحتوي على روابط عرضية وله تركيب شبكي يحمل مجاميع وظيفية functional groups (وهي الكتروليتات) تتم على سطحها عملية التبادل الايوني ·

وتكون عمليات التبادل الايوني اتزانية اذ تتضمن : ـ (1) نفاذ الايون خلال فيلم السائل المحيط بالمبادل والوصول الى سطحه أولا ومن ثم الى موقع التبادل ، (2) عملية التبادل ، (3) خروج الايون المتبادل من داخل التركيب الشكبي الى خارجه بعيدا عن السطح ، كما هو موضح في الشكل (22.12) ·
وتقسم المبادلات الايونية تبعا الى منشئها الى مبادلات ايونية طبيعية natural ومبادلات ايونية مخلقة synthetic . وتمثل الاخيرة أهم مجموعة من المبادلات

الايونية اذ يتم تخليقها اما بواسطة التكثيف التجميعي polycondensation او بواسطة البلمرة polymerization للستيارين المتعدد polystyrene ٠

كما يمكن تقسيم المبادلات الايونية تبعا لطبيعة مجاميعها الوظيفية الفعالة الى : —

(1) مبادلات كاتيونية Cation exchangers اذ تحمل باستمرار شحنة سالبة عند تأين مجاميعها الوظيفية (سلفون أو كربوكسيل أو فينول) وعليه فانها تستطيع استبدال اي كاتيون يحمل شحنة موجبة ٠



الشكل (22.12) ميكانيكية كروماتوجرافي التبادل الايوني (ان الاحتفاظ بالايون Y^- يتحدد بواسطة درجة انحلال AY وكذلك بواسطة ميل او الفة Y^- وتركيزه بالمقارنة مع تركيز X^-)

(2) مبادلات انيونية Anion exchangers وهذه تحمل شحنة موجبة عند تأين مجاميعها الوظيفية النشطة (مجاميع الامونيوم الرباعية او السلفونيوم او الامين الاولي والثانوي والثلاثي) ويمكن ان تستبدل اي انيون يحمل شحنة سالبة ٠

ويجب معاملة الراتنجات قبل استخدامها في التحليل ٠ ففي حالة الراتنجات الكاتيونية يتم ملء العمود بحجم معين من الراتنج حسب طريقة التحليل ، ويدعى الحجم الذي يشغله الراتنج في العمود بحجم المبادل Bed-volume ٠ بعد ذلك يغسل بحجمين من 2 N-HCl وخمسة احجام من الماء ثم بحجمين من 1.5 N-NaOH واخيرا بخمسة احجام من الماء ٠ وقد تتغير هذه الحجوم تبعا لنوع التحليل والراتنج

وطول عمود المبادل • وينبغي دائما ملاحظة ان يكون الراتنج مغطى بالمحلـول • ويختبر المحلول المتدفق من أسفل العمود في المرحلة الاخيـــرة بواسـطة دليـــل الفينولفثالين للتأكد من ازالة أي زيادة من هيدروكسيد الصوديوم • ثـم يغسـل المبادل بحجمين من الايثانول وبحجمين من الماء المتعادل (ينبغي ان يكون المـــاء المستخدم في الغسيل خال من المعادن او الايونات **Deionized water**) • وفي هذه الحالة يكون الراتنج في الصورة الصوديومية ، ولجعله في الصورة الهيدروجينية يعاد غسله بـ **2 N-HCl** ومن ثم الغسيل بالماء •

وفي حالة الراتنجات الانيونية يتبع نفس الاسلوب السابق ولكن بدءا بالغسيل بـ **1.5 N-NaOH** ومن ثم **2 N-HCl** ، ويجب ان يعطي ماء الغسيل النهائي اختبارا سالبا مع نترات الفضة (اي لايوجد راسب كلوريد الفضة) • وعند هذه المرحلة يكون الراتنج في صورة الكلوريد ولجعله في صورة الهيدروكسيد يعامـــل بـــ **1.5 N-NaOH** ثم الغسيل بالماء •

وبعد انتهاء التحليل وفصل مكونات المخاليط المجهولة يجدد المبادل الايونـــي **Regeneration** لاعادة استخدامه من جديد • وتجدد المبـــادلات الكايتونيـــة باستخدام الاحماض مثل **HCl** في حين تستخدم القواعد مثل **NaOH** في تجديـد المبادلات الانيونية وكما سبق ذكره بالامكان التعرف على تمام عملية الغسيل بتتبع الاس الهيدروجيني او قياس المقاومة الكهربائية لمحلول الغسيل •

وتستخدم راتنجات التبادل الايوني في فصـــل وتحليـــل مخاليط الاحماض الامينية ونواتج تحلل البروتينات وفي فصل وتقدير الاحماض النووية والقواعـد النتروجينية وكذلك الاحماض العضـــوية والالدهيدات والكيتونات واســـتخدامات عديدة اخرى سواء ما يتعلق ببيئة التخمر او نواتجه •

وهناك مبادلات ايونية اخرى غير راتنجية هي المبادلات الايونية السليلوزية ، اذ تمتاز الياف السليلوز بكونها محبة للماء وان طبيعتها الليفية تجعل من مجاميعها الوظيفية أقرب وأسهل في الوصول اليهـا حتى للجزيئـات الضخمة الموجودة في المحلول المحيط بها . وعلى ذلك فان السعة الفعالة لهذه المبادلات تكون أعلى من تلك التي للمبادلات الراتنجية •

ومن المعروف ان السليلوز يتكون من وحدات الجلوكوز المرتبطة ببعضها بروابط β (1 ← 4) لجلايكوسيدية ، وبالامكان استبدال مجاميع الهيدروكسيل في المواقع 6, 3, 2 بمجاميع وظيفية أخرى ، وتمتلك المشتقات الناتجة قدرة تبادل ايوني كبيرة • ومن المبادلات الكاتيونية السليلوزية ، كربوكسي مثيل سليلوز CM-cellulose والسليلوز المفسفر Phosphorylated cellulose وسلفومثيل سليلوز Sulfomethyl cellulose . ومن المبادلات الانيونية السليلوزية ، أمينو أثيل سليلوز AE-Cellulose وثنائي أثيل أمينو أثيل سليلوز DEAE-Cellulose وثلاثي أثيل أمينو أثيل سليلوز TEAE-Cellulose •

وتحضر هذه المشتقات في صورة رقائق flakes أو مسحوق أو ورق التقديرات المختلفة ، وتمتاز بأنها تقاوم المحاليل الحامضية والقلوية الضعيفة كما يمكن تجديدها واعادة استخدامها مرارا ويتحدد ثباتها بثبات التركيب الشبكي matrix •

ويجدد عمود المبادل السليلوزي بالغسيل المتتابع بكل من محلول 2 M-NaCl (بمقدار ضعف حجم العمود) ثم بالماء (4 حجوم) ثم 1 N-NaOH (4 حجوم) ثم الماء (4 حجوم) • اما المبادل الانيوني فانه يستمر في غسله بعدما سبق بحامض 1 N-Hcl (حجمان) ثم بماء سبق غليه وتبريده (4 حجوم) واخيرا يجري التوازن باول محلول منظم سيتم استعماله وبذلك يصبح المبادل جاهزا للاستعمال • ويستفاد من المبادلات الايونية السليلوزية في فصل البروتينات والنيوكليوتيدات والاحماض النووية وغيرها من المركبات الموجودة في بيئة التخمر او ناتج التخمر •

2 . 14 . الغربلة الجزيئية او الترشيح بالهلام Molecular Sieving or Gel Filtration

يمكن فصل المواد تبعا لاحجامها الجزيئية أو بمعنى ادق تبعا لاوزانها الجزيئية بواسطة الغربلة الجزيئية التي يمكن ان تتم في اعمدة حيث يعبأ الهلام في عمود لاجراء الفصل داخله أو بشكل طبقات رقيقة Thin-Layer Gel حيث يكون الهلام منشورا على سطح جسم صلب • ويعتمد هذا النوع من التحليل على ظاهرتين اساسيتين :—

الاولى : ظاهرة توزيع جزيئات المذاب بين وجهين احدهما ثابت وهو في هذه

الحالة حبيبات الهلام المتشربة (المتنفخة) بالماء والاخر متحرك يمثله محلول الاظهار أو التحميض الذي يحتوي على النموذج ٠

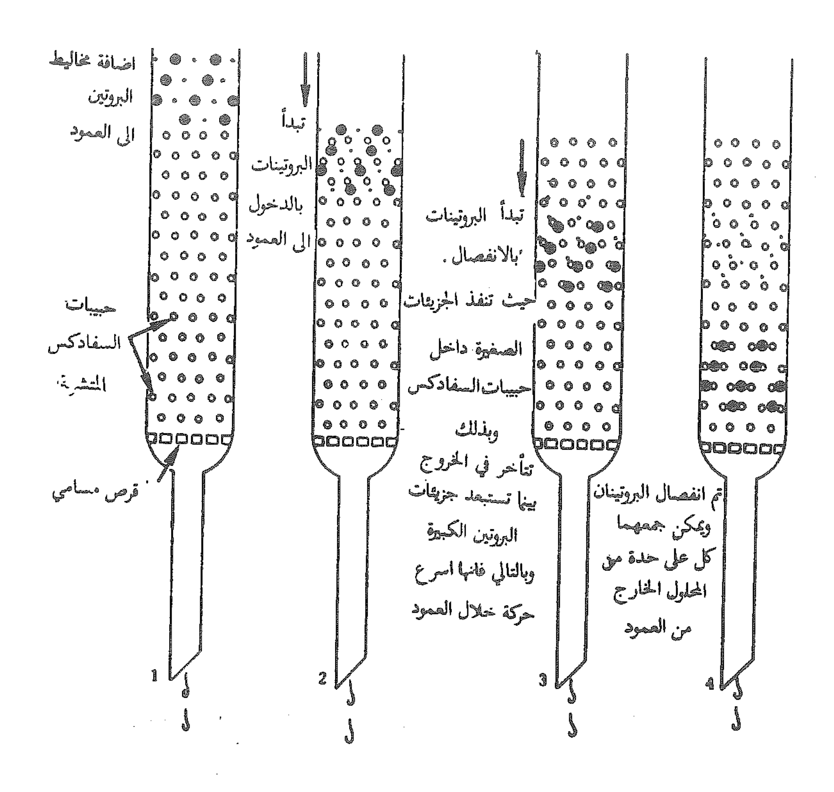
الثانية : ظاهرة الغربلة الجزيئية التي تتم داخل حبيبة الهلام نفسها ٠

وبصورة عامة اذا كانت ثقوب الشبكة أكبر من جزيئات المذاب فان الاخيرة تدخل خلال التركيب الشبكي وتستغرق وقتا طويلا للخروج منه وبالتالي يتأخر خروجها من نهاية العمود ٠ ويحدث العكس اذا كانت ثقوب الشبكة اصغر من جزيئات المذاب اذ تبقى الاخيرة في الوجه المتحرك وتخرج بسرعة من نهاية العمود ٠ وان كل مرحلة من المراحل السابقة سواء كانت عملية التوزيع بين الوجهين الثابت والمتحرك أو عملية الغربلة (الفصل) الجزيئية داخل حبيبة الهلام لها اتزان وثابت اتزان **Equilibrium constant** .

فالجزيئات الكبيرة الحجم يلزمها وقت قصير للخروج من نهاية العمود وبالتالي فانها تحتاج الى حجم استرداد صغير **Elution Volume (Ve)** ، وعادة يكون حجم الاسترداد اقل من حجم طبقة الهلام (او العمود) **Bed Volume**. وقد وجدت علاقة كبيرة بين حجم الاسترداد (**Ve**) وبين الوزن الجزيئي للمذاب ، اي كلما زاد الوزن الجزيئي للمذاب فانه يحتاج الى حجم استرداد أقل كما هو موضح في الشكل **(23.12)** والشكل **(24.12)** ولهذه الطريقة من التحليل اسماء مختلفة منها كروماتوجرافي الغربلة الجزيئية أو كروماتوجرافي الترشيح بالهلام او كروماتوجرافي الرفض او الاقصاء **Exclusion Chromatography** .

وكلمة هلام **Gel** تعني مادة رخوة مرنة تحتوي على ماء (وهناك انواع من هلامات لاتنتفخ بالماء فقط وانما بالمذيبات العضوية ايضا) لها تركيب ثلاثي لابعاد يحتوي على روابط عرضية تعطي للهلام الثبات الميكانيكي ٠

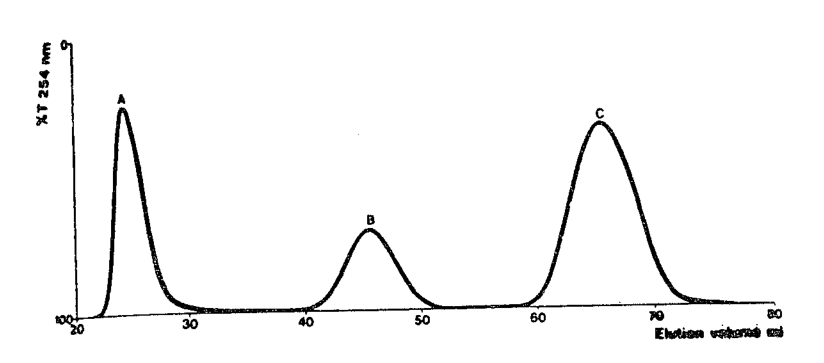
وهناك العديد من المواد الطبيعية القادرة على تكوين الهلام ، وهذه تشمل السكريات المتعددة من الفواكه والجذور ، والبروتينات من الانسجة الحيوانية ، والسليكات والفوسفات اللاعضوية ٠ وبعملية الارتباط العرضي مع مادة رابطة عرضية مناسبة وغالبا ما تكون كبيرة الجزيء (مخلقة او طبيعية) يمكن تكوين هلام في مذيب مناسب ٠



الشكل (23.12) ° رسم تخطيطي لكروماتوجرافي الترشيح بالهلام °

والهلامات المختلفة تتفاعل بشكل متفاوت لازالة السائل منها ° وهناك مجموعة من الهلامات يطلق عليها Xerogels وهي التي تنكمش عند التجفيف إلى مادة متراصة تحتوي على مادة الهلام فقط °في حين المجموعة الاخرى من الهلامات المسماة Aerogels لا تنكمش وبدلا من ذلك ينفذ الهواء المحيط الى الهلام ° وعندما تلامس هلامات Xerogels السائل المناسب لمادة الهلام فانها تمتصه وتنتفخ وتعود الى حالة الهلام ° في حين في حالة هلامات Aerogels يستبدل الهواء الموجود في الهلام بالسائل عند تعريض الهلام الجاف له ° وفي هذه العملية

فان جميع الهلامات لا تعود الى حالتها الاصلية كما ان من الهلامات تغير خواصها عند التجفيف والترطيب ٠



الشكل (24.12) ٠ فصل مخلوط الديكستران الازرق Blue Dextran 2000 وسايتوكروم c وفيتامين B_{12} على سفادكس G-75

[حيث : طول العمود = 1.6 × 35سم ، حجم العينة 1 مل وتحتوي على 2 ملغم من الديكستران الازرق 2000 و 2 ملغم من سايتوكروم C و 1 ملغم من فيتامين B_{12} ، المحلول المسترد هو بفر الفوسفات(0.05M, pH 7.08)يحتوي على NaCl (0.1 M) سرعة السريان = 0.2 مل / دقيقة ، والذروات هي A = الديكستران الازرق (وزنه الجزيئي 2,000,000) B = سايتروكروم C (وزنه الجزيئي 12.500) C = فيتامين B_{12} (وزنه الجزيئي 1,350)] ٠

ومن وجهة نظر الخواص الكروماتوجرافية والخواص العامة للهلام فان هناك نوعين مختلفين يمكن التمييز بينهما هما : هلام macroreticular وهلام microreticular ٠ فالهلامات من نوع macroreticular لها خواص تشير الى ان تركيبها الدقيق يكون مختلفا كثيرا اذ ان هناك مناطق تتجمع فيها مادة الهلام gel matrix ومناطق تحتوي على قدر قليل جدا من هذه المادة ٠ وهذا التركيب ذو الفراغات الكبيرة الخالي من مادة الهلام يسمح بدخول الجزيئات

الكبيرة في حين مناطق الكثافة العالية من مادة الهلام تثبت الهلام وتجعله صلبا ٠
في حين للهلامات من نوع microreticular خواص تشير الى ان مادة الهلام تكون موزعة بانتظام خلال الهلام ، وعليه فانها تفصل مجالات منخفضة من الاوزان الجزئية مقارنة بهلامات macroreticular وعادة ما تكون هذه الهلامات طرية ٠

ومكذا فان هلامات macroreticular عادة ما تكون من نوع هلامات Aerogels في حين غالبا ما تكون هلامات microreticular من نوع هلامات Xerogels .

ومن بين العديد من الهلامات الموجودة او التي يمكن تخليقها فان عددا قليلا فقط يكون مناسبا لكروماتوجرافي الهلام ٠ وفضلا عن الاحتياجات الكروماتوجرافية فان الهلامات ينبغي ان تفي ببعض المتطلبات العملية ومنها :

(1) ان تكون مادة الهلام خاملة ٠
(2) ان يكون الهلام ثابتا كيمياويا ٠
(3) ان يحتوي على أقل ما يمكن من المجاميع الايونية لتجنب تأثيرات التبادل الايوني ٠
(4) امكانية كبيرة للمفاضلة بين انواع الهلام التي لها نفس التركيب الكيمياوي العام ولكن بمجالات تجزئة مختلفة وذلك لتسهيل عمليات الفصل المختلفة ٠
(5) امكانية التحكم بدقة بحجم الحبيبات وكذلك توزيعها بانتظام ٠
(6) ان تكون الصلابة الميكانيكية لحبيبات الهلام عالية قدر الامكان والا فانها تميل للتشوه بواسطة القوى المسببة من سريان السائل خلال طبقة الهلام ٠

وهناك أربعة أنواع من الهلامات تستخدم في الغربلة الجزئية ، ثلاثة منها تنتفخ بالماء والنوع الرابع له القدرة على الانتفاخ في الماء وفي المذيبات غير القطبية وهي :ـ

(1) هلامات الديكستران (السفادكس) Dextran gels (Sephadex)
(2) هلامات بولي اكريل اميد Polyacrylamide gels, Bio-Gel
(3) هلامات الاجار والاجاروز Agar and Agarose gels
(4) هلام السفادكس الاقل قطبية Sephadex LH-20

3 .طرق التحليل البيولوجية Biolоogical Assays

تتضمن طرق التحليل البيولوجية اولا التحليلات التي يقوم فيها المركب المراد تقديره بحث أو خفض نمو كائن الاختبار المجهري الحساس ، وثانيا التحليلات التي تستخدم الانزيمات • وعادة تكون طرق التحليل البيولوجية صعبة الانجاز او الاداء ، وذات اخطاء كبيرة واقل تكرارية من طرق التحليل الكيمياوية او الفيزياوية • لذلك تعد العناية الكبيرة في القياس عند كل خطوة من خطوات التحليل الزامية • وفي الحقيقة أن هذه التحليلات لا تستعمل عادة اذا تيسرت طريقة تحليل جيدة بديلة سواء كانت فيزياوية ام كيمياوية •

وقد تكون كائنات الاختبار المستخدمة في التحليلات البيولوجية سلالة موجودة اعتياديا في الطبيعة ، او قد يكون سلالات تم احداث طفرات صناعية فيها من اجل استخدامها في تحليل معين • وكمثال عن الحالة الاخيرة هي السلالة الميكروبية التي تطفرت ، بسبب نقص الانزيمات ، بحيث تحتاج الى مركب معين للنمو وتوفر استجابة نمو متدرجة في وجود مستويات متفاوتة من هذا المركب • وهناك أنواع مختلفة من الاحياء المجهرية المستخدمة في التحليلات البيولوجية • اذ استخدمت البكتريا في تحليل الاحماض الامينية والمضادات الحيوية والفيتأمينات • واستخدمت الخمائر في تحليل الفيتامينات والمضادات الحيوية • في حين استخدمت الفطريات في تحليل الفيتامينات والمعادن الضئيلة والمضادات الحيوية ومبيدات الفطريات والمواد الموقفة لنموها • كما استخدمت **Euglena gracilis** وهي من البروتوزوا في في تحليل فيتامين B_{12} • وعليه من الناحية العملية بالامكان استخدام أي كائن حي مجهري اذا استجاب بطريقة متدرجة الى تركيزات متفاوتة من المادة المراد تقديرها •

وبصرف النظر عن الكائن الحي المختار للتحليل المعين ، فانه يجب أن يفي بعدد من المتطلبات لكي يعد كائن اختبار جيد :ـ

(1) أن يكون له ثبات بحيث لا تحدث تغيرات غير مرغوبة في الاستجابة للمركب المختبر •

(2) ان يستجيب بطريقة متدرجة للمركب المختبر فقط وليس للمواد

الاخرى التي قد تتواجد في المحلول تحت الاختبار ٠

(3) أن ينمو بطريقة سريعة نسبيا على بيئة بسيطة ، ويفضل أن لا يكون كائنا ممرضا ٠

(4) ان ينمو بطريقة تسهل من متابعة وقراءة التقدير ٠ اي يجب ان لا تتجمع الخلايا عند تقدير المكارة أو أن لا تحتشد عبر سطح الاجار عند التقدير بطريقة الانتشار ٠

(5) ان يكون هوائيا او هوائيا اختيارا نظرا لصعوبة انجاز التحليلات اللاهوائية ولاحتياجها الى معدات خاصة ٠

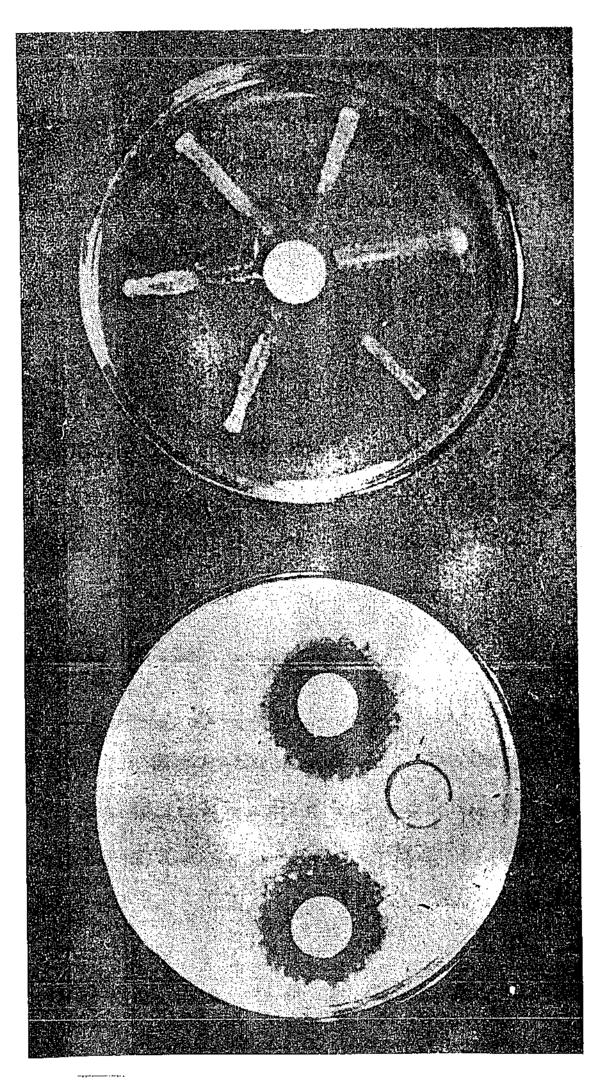
(6) واخيرا ، ان ينمو جيدا عند pH لا يؤثر في ثبات وسمية المادة تحت الاختبار

وتقع طرق التحليل البيولوجية في أربعة مجاميع رئيسة هي : التحليل بالانتشار ، والتحليل بقياس المكارة ، والتحليل بالاستجابة الايضية ، والتحليل بالانزيمات ٠ وسنتكلم عن كل مجموعة بشيء من التفصيل ٠

1.3 طرق التحليل بالانتشار Diffusion Assays

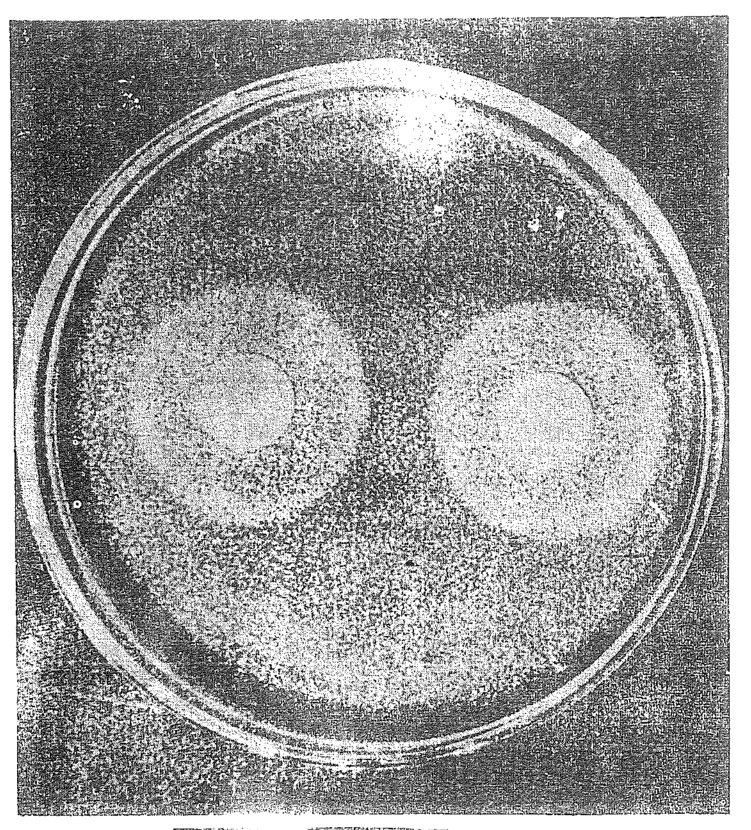
تجري طرق التحليل بالانتشار على بيئة صلبة ، وعادة بيئة الاجار ، التي تعد مناسبة لنمو كائن الاختبار ٠ ويسمح للمركب المراد تقديره بالانتشار خلال البيئة وبشكل نصف قطري من وسادة أو قبمة بحيث أن نمو كائن الاختبار المتأخم اما أن ينخفض كما هو الحال مع مضاد حيوي (الشكل 25.12) ، أو أن يحث كما هو الحال مع عامل نمو (الشكل 26.12) ٠ ويشير قطر هذه المساحة الى تركيز المركب تحت الاختبار ، ويقارن مع اقطار من مناطق مماثلة متكونة بواسطة تركيزات مختلفة معلومة من المركب القياسي او المرجعي ٠ ويرسم منحني يبين اقطار المناطق للمركب القياسي ازاء لوغاريتم التركيزات المستخدمة ، ويستخدم الجزء الخطي من هذا المنحني القياسي في تعيين التركيز الفعلي للنموذج تحت التحليل ٠

وهناك طريقتان من التحليل بالانتشار ، ورغم تماثلهما نوعا ما ، الا ان لكل طريقة ميزاتها الخاصة ٠ ففي طريقة الاسطوانة Cylinder Method (الشكل 27.12) فان جزءا من محلول المضاد الحيوي او اي ناتج تخمري اخر ينتشر من مستودع reservoir او اسطوانة الى الاجار المحيط ٠ في حين في



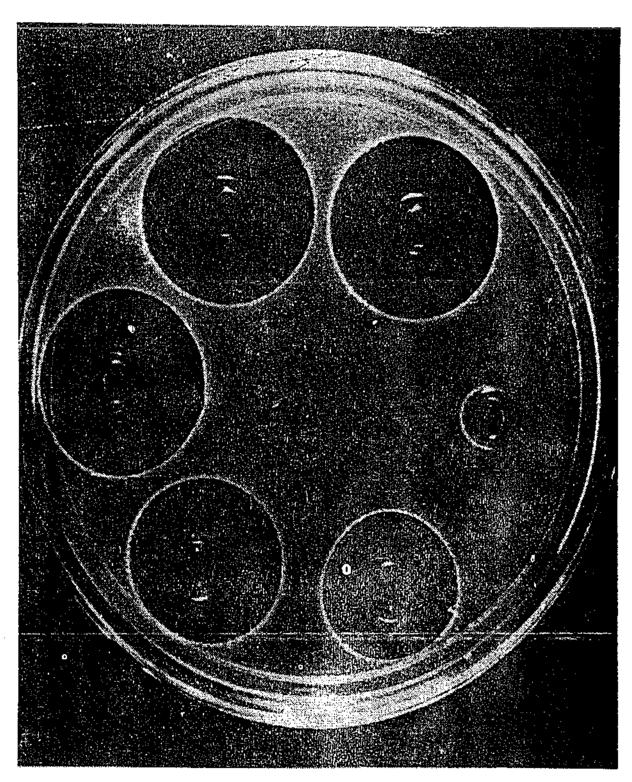
الشكل (25.12) . تشبيط النمو بواسطه انتشار المضاد الحيوي خلال بيئة الاجار ، **قرص ورقي** .

(تم تخطيط الاجار في الطبق العلوي بستة كائنات اختبار مختلفة ، وقـــد زر الطبق السفلي بفطر . ولم يظهر القرص الرابع في الطبق السفلي لكونه غير مرئ بسبب النقص في نشاط المضاد الحيوي) .



الشكل 26.12 حث النمو بواسطة مادة تنتشر من قرص ورقي
(وقد زرع السطح الكلي للاجار بكائن الاختبار البكتيري)

طريقة القرص الورقي Paper-disc Method (الشكل 25.12 والشكل (26.12)) يضاف مقدار محدود من محلول التحضير مثل 0.1 مل الى القرص . اذ يوضع مقدار مقاس من بيئة ، مثلا 10 مل ، في أطباق بتري ويترك ليتصلب . وحال تصلب هذه الطبقة الاساس ، يضاف مقدار مقاس (عادة حوالي 5 مل) من نفس بيئة الاجار او غيرها ملحقة بكائن الاختبار المجهري فوق الطبقة الاساس ويسمح بالتصلب لتكوين طبقة اجار مبذورة seeded-agar . وتوضع عدة اسطوانات صغيرة من المعدن او من الخزف الصيني الصقيل او من الزجاج على سطح الاجار .



الشكل (27.12). التحليل الحيوي لانتشار المضادات الحيوية بواسطة الاسطوانات . (حيث تملأ الاسطوانات بالعينات المحتوية على تراكيز مختلفة من المضاد الحيوي)

ويساعد التسخين المسبق لهذه الاسطوانات على احكامها في الاجار . ويعتمد عدد الاسطوانات المستخدمة لكل طبق على احجام المناطق المتدفمة نظرا لوجوب عـــدم تداخل هذه المناطق ، وقد تخفف النماذج لتقييد المناطق . وتمـــلاء الاسطوانات بالتخفيفات المناسبة من المحاليل المراد تحليلها او بالمحاليل المحتوية على تركيـزات معلومة من المركب المرجعي . وتحضن الاطباق لفترة زمنية معينة على درجة حرارة ثابتة . ثم يقاس أقطار مناطق النمو المحثة أو مناطق النمو المنخفضة بالمليمترات ، ويعين تراكيز المحاليل تحت الاختبار بالمقارنة مع المنحني القياسي المحضـــر مـن معلومات مناطق التشبيط أو الحث للمواد القياسية . وللحصول على نتائج صحيحة

وقابلة للتكرار ، ينبغي تكرار كل نموذج من المركب المجهول وكذلك كـل تركيز من المركب المرجعي عدة مرات وعلى أطباق مختلفة بحيث يمكن حساب متوسطاتها • ويجب أن يحتوي كل طبق تحليل على اسطوانة فيها تركيز واحد من المحلول القياسي في الاقل اضافة الى نماذج التخمر ، وذلك لانه من المرجح أن يكون التغاير فـي أحجام المناطق أكبر عند مقارنة القيم المتحصلة من أطباق مختلفة من مقارنة القيم المتحصلة من نفس الطبق •

وفي طريقة التحليل بالقرص الورقي ، تحضر أطباق بيئة الاجار المبذورة وتلقح كما هو الحال في طريقة التحليل بالاسطوانة • ومع ذلك فان المحاليل المراد تحليلها أو محاليل المركب المرجعي يتم اضافتها بحجم 0.1 مل الى أقراص ورق الترشيح المعقمة (عادة بقطر 12.8 ملم) الممدودة على سطح الاجار المبذور • ويماثل التحضين وكذلك حساب نتائج التحليل تلك التي لطريقـة الاسطوانة • وكذلك تجد طريقة التحليل بالقرص الورقي استخداما عندما تكون نواتج التخمر المراد تحليلها مذابة في مذيبات سامـة لكائـن الاختبار • اذ تضـاف المحاليل الى الاقراص الممدودة على طبق زجاجي ثم يسمح للمذيبات بالتبخر قبل وضـع الاقراص على بيئة الاجار المبذورة من أجل التحليل •

2.3. طرق التحليل بقياس العكارة والنمو Turbidimetric and Growth Assays

إن طرق التحليل بقياس العكارة هي تلك الطرق التي يقاس فيها تأثير المركب تحت الاختبار في المزرعة السائلة كزيادة أو نقصان في العكارة المترافقة مع معدل النمو أو النمو الكلي للكائن الحي المجهري • اذ يتم توزيع مقدار مناسب من البيئة السائلة على سلسلة من الانابيب ثم تضاف مقادير متدرجة من المادة المراد تحليلها • وتلقح الانابيب بمقدار صغير وثابت من مزرعة كائن الاختبار النشطة الفتية ، ثم تحضن لفترة من الزمن مقدرة سلفا وعلى درجة حرارة ثابتة • ويتوقف طول فترة التحضين المراد استخدامه على عاملين :ـ

(1) اما أن يتم قياس عكارة المزارع عند نقطة معينة خلال النمو اللوغاريتمي ، من أجل معرفة تأثير المركب في معدل النمو •

(2) أو أن يتم قياس عكارة المزارع خلال طور النمو الثابت عند بلوغه الحـد

الاقصى ، من أجل معرفة تأثير المركب في النمو الكلي للكائن الحي الذي يمكن أن يحدث في البيئة المعينة ٠

كما يمكن تقدير العكارة النسبية المتكونة في الانابيب بصريا ٠ ومع ذلك فان هذه التقديرات عادة ما تستخدم السبكتروفوتوميتر Spectrophotometer مع مرشح أو أداة تفريد الضوء diffraction grating للسماح بمرور حزمة طول موجي ضيقة من الضوء المنظور ٠ ويتم تحديد اختيار أطوال الموجات بواسطة لون البيئة بحيث يكون لون البيئة عند أطوال الموجات المناسبة قليل التأثير في التحليل ٠

وتؤخذ القراءات ككثافة ضوئية Optical density أو امتصاص ضوئي Absorbance ٠ واذا كان الجهاز يقيس النسبة المئوية للضوء النافذ light transmittance ، فانه بالامكان تحويل القراءات الى امتصاصية ضوئية بسهولة ٠ وترسم الامتصاصية ازاء تركيز المركب القياسي للحصول على منحنى قياسي ٠ وعادة يكون جزء من المنحنى خطيا ، رغم انه في بعض الحالات يكون من الضروري تحويل التركيز أو الامتصاصية أو كليهما الى قراءات لوغاريتمية للحصول على منحنى خطي ٠

ويضاف ناتج التخمر المراد تقديره بعدة تخفيفات مختلفة رغم ان تخفيفا واحدا يكون كافيا من الناحية النظرية ٠ ويعد هذا الاحتياط ضروريا عند تكون المواد المراد تقديرها لم يسبق تحليلها بشكل روتيني ٠ لذلك فان اجراء اختبار بمستويات مختلفة من المادة المجهولة يضمن مطابقة الامتصاصية المتحصل عليها من أحد التخفيفات للجزء الخطي من المنحنى القياسي ٠ وعليه ينبغي ان تكون القيم النهائية للتحليل المتحصل عليها من تخفيفين أو أكثر للنموذج متطابقة ٠

3.3 طرق التحليل بالاستجابة الايضية Metabolic Response Assays

تتشابه طرق التحليل بالاستجابة الايضية مع طرق التحليل بقياس العكارة فيما عدا أسلوب قياس التأثير ٠ اذ بدلا من قياس تأثير ناتج التخمر في معدل النمو أو النمو الكلي لكائن الاختبار ، فان هذه الطرق تقيس تأثير ناتج التخمر في بعض التفاعلات الايضية التي يقوم بها كائن الاختبار خلال النمو ٠ ومن بعض

التفاعلات الأيضية المستخدمة في تحليلات من هذا النوع : انتاج الحامض ، وتحرر غـــاز ثانـي أوكسيد الكـربون ، وامتصـاص الاوكسجين ، ونشـاط انـزيم الديهيدروجينيز ٠

4.3 طرق التحليل الانزيمية Enzymatic Assays

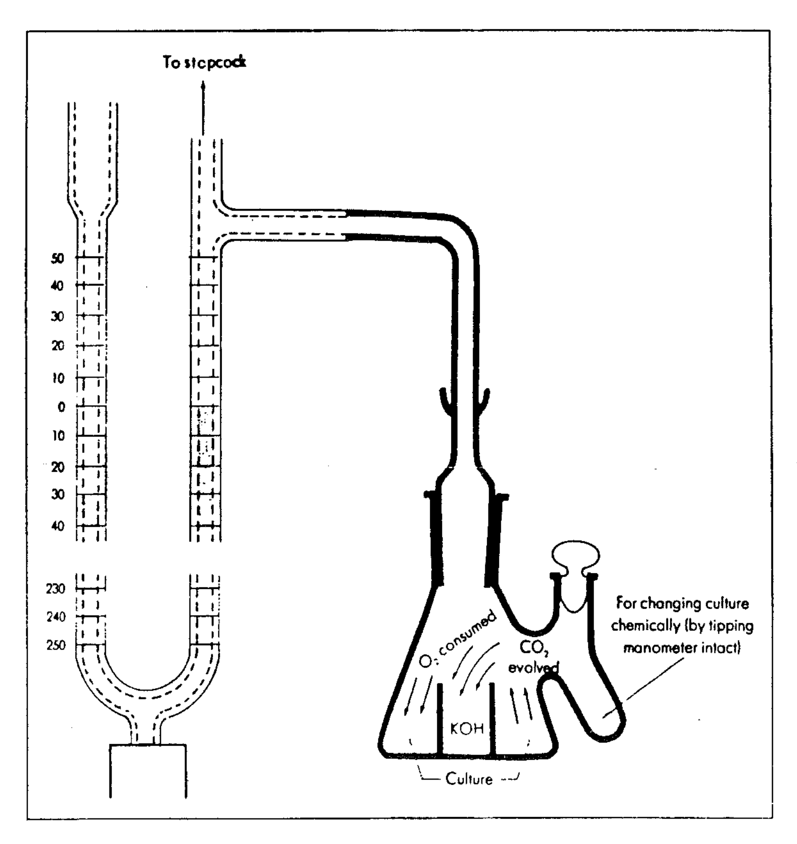
تعد طرق التحليل الانزيمية عالية التخصص ، ويمكنها كشف مقادير متناهية الصغر من نواتج التخمر اضافة الى قدرتها على التمييز بين الصور الفعالة بيولوجيا وغير الفعالة المركب ٠ اذ يتم تحضين تحضير انزيمي (سواء من مصدر تجاري أو مزرعة ميكروبية) مع نمـوذج من المزرعـة السـائلة وذلك لاحـداث تغيير انزيمي معين في ناتج التخمر ، كالتحلل الجزئي مع تكوين ناتج قابـل للقياس ٠ وعلى سبيل المثال يمكن تقدير حامض جلوتاميك في نموذج صغير من سائل التخمر باضافة الخلايا المغسولة لسلالات معينة من Escerichia coli التي تحتوي على انزيم جلوتاميك أسيد دي كربو كسيليز ٠ ويضاف التولوين الى هذا المخلوط لتحرير الانزيم من الخلايا ، ويجرى التقدير عنـد pH 5.0 . ويتحرر جزيء واحد من CO_2 من كل جزيء حامض الجلوتاميك ٠ ونظرا لكـون

CO_2 قليل الذوبان في الماء عند هذا الـ PH فانه يتحرر الى الجو كغاز يقاس بوسائل مانومترية كما هو الحال في استخدام جهـاز فاربورج لقيـاس التنفس Warburg manometer or respirometer . (الشكل 28.12) ٠ وقـد لا يضاف التولوين اذا كانت خلايا البكتريا قد تم تجفيفها بالفراغ in vacuo وفوق $CaCl_2$ أو تجفيفها بالغسل المتكرر باستخدام الاسيتون البارد (مسحوق الاسيتون acetone powder) ٠

وينبغي اختبار طرق التحليل الانزيمية بعناية لتحـديد دقتهـا العملية تحت الظروف الخاصة بالتجربة ٠ لذلك يضـاف مقدار معلـوم من النـاتج الكيمياوي النقي كمادة قياسية داخلية الى نموذج من سائل التخمر النموذجي وليس الى نموذج آخر ٠ وينبغي لنتائج التحليل ان تعكس كميا مقدار المادة الكيمياوية المضافة ٠ وفي حالة فشل هذا الاختبار تبحث الاحتمالات التالية :ـ

(1) قد يكون pH أو درجة حرارة التحليل غير مثلى للانزيم أو أن يكون الانزيم غير فعال تحت هذه الظروف ٠

(2) قد توجد مركبات في نموذج سائل التخمر ، كالمعادن أو مواد تفاعل بديلة ، تثبط الانزيم أو تتنافس على المواضع الفعالة active sites .



(حيث يغمر الدورق في حمام مائي ذا درجة حرارة ثابتة ، وعند بدء التجـربة يكون مستوى السائل في كلا العمودين متساويا ٠ ونتيجة لاستهلاك الاوكسجين في الدورق فان ضغط الغاز ينخفض وهذا ينعكس في ارتفاع السائل في العمـــود الداخلي ٠ وبواسطة هذه التغيرات يمكن حساب كمية الاوكسجين المستهلكة فـي التفاعل) ٠

(3) قد يكون الانزيم غير ثابت في الاصل أو غير ثابت تحت ظروف التحليل .

(4) قد يكون الانزيم غير موجود اصلا عند الاعتماد على مصادر ميكروبية في انتاجه ، نظرا لان ذلك قد يتطلب وجود ظروف نمو خاصة لم تتوفر للكائن الحي .

(5) قد يكون الانزيم مخزونا بصورة غير ملائمة ، لذلك يجب الحصول على هذه التحضيرات من مصدر يعول عليه ويخزن جافا تحت التبريد بدون أن يصبح عتيقا قبل الاستعمال .

(6) قد يكون التخصص الانزيمي اما واطئا او عاليا جدا . ومن الواضح اذا هاجم الانزيم مركبات اخرى (كالايسومرات الفراغية) في المزرعة السائلة غير ناتج التخمر فانه سيعطي نتائج مغلوطة .

(7) من الجائز أن لا يقوم التولوين باطلاق الانزيم ، لذلك يمكن استبداله بمذيبات اخرى كالبيوتانول والكلوروفورم .

(8) وقد يحتوي المصدر الانزيمي أو سائل التخمر على انزيمات أخرى قادرة على اجراء هدم اضافي لناتج النشاط الانزيمي الاولي . وهذا يمكن تجنبه بالسماح لنشاط الانزيم الرئيس ان يجري تحت ظروف مثلى من pH ودرجة حرارة لا تكون مثلى لنشاطات الانزيمات الاخرى الموجودة .

الفصل الثالث عشر

معاملات مخلفات التخمر

Fermentation Waste Treatments

1 . مقدمة

2 . هدف معاملة مخلفات التخمر

3 . الاحتياج للاوكسجين البيولوجي او الكيمياوي

4 . طرق التخلص من المخلفات

1.4 طرق الهضم اللاهوائية

2.4 طرق الهضم الهوائية

5 . بعض الاعتبارات المهمة في طرق التخلص من المخلفات

1. مقدمة Introduction

ينتج عن اغلب العمليات الصناعية مخلفات مائية تحتوي على كميات متفاوتة من الاملاح والمواد العضوية ٠ وتحتوي المخلفات المرتبطة بالصناعات التخمرية على بيئات مستهلكة، ومياه غسيل ، ومياه متجمعة في الخطوات المختلفة من عملية استرجاع الناتج ٠ وكذلك تتجمع مذيبات عضوية خـلال استرجاع نواتج التخمر الصناعي الا ان هذه المخلفات تعرض مشاكل مختلفة كلية عن المشاكل السابقة ولن ندرجها في المناقشة ٠

ان المياه المتخلفة من عمليات التخمر الصناعي تحتوي على غرويات ذائبـة بالماء ومخلفات عالقة وهي في هذا الخصوص تشبه تقريبا مخلفات المجاري العامة في متطلبات معاملاتها ٠ وفي الحقيقة ان هذه المخلفات قد تضاف احيانا وبدون اية معاملة اضافية الى شبكة المجاري من اجل معالجتها بواسطة امكانيات البلدية كبقية مياه المجاري ٠ وبصرف النظر عما يحدث ، لايجوز ان يتم التخلص من هذه المخلفات بطرحها مباشرة في الجداول او البحيرات او الانهار ، بسبب محتواها العالي من المادة العضوية غير المتحللة ٠

ان بعض مخلفات التخمر تحتاج الى معالجة خاصة قبل بدء المعاملة ٠ فـاذا استخدم في التخمر احد ممرضات النبات او الحيوان ، فان مخلفات التخمر تحتاج الى عملية تعقيم قبل أن تخضع لمعاملة المخلفات ٠ وفي الحقيقة ، يستحسن في بعض الاحيان تعقيم مخلفات التخمر بصرف النظر عن استخدام ممرض في التخمر مـن عدمه بحيث ان الكائن الحي المجهري الخاص بالتخمر لا يمكن عزله ثانيـة بصورة سهلة من المياه المتخلفة بواسطة مؤسسة صناعية منافسة ٠ وكذلك قد تحتاج البيئات المستهلكة او بقايا البيئات الى ترشيح مبدئي قبل تعزيز المعاملة وذلك لازالة الجوامد او الكتل الكبيرة للخلايا الميكروبية ٠ واخيرا ، فان المياه المتخلفة الشديدة الحموضة أو القلوية قد يحتاج الى معادلتها قبل تعزيز المعاملة البيولوجية للمخلفات ٠

وأما أن تعامل مصانع التخمرات الصناعية مياهها المتخلفة بوسائلها الذاتية وحسب الطريقة التي ترتئيها بانها الاصلح أو أن تقوم بطرح مياهها مع مياه المجاري لتجري معاملتها من قبل البلدية ٠ وفي الحالة الاخيرة لا تكون جميـع الترتيبات

ممكنة اذ تحتاج الى بعض امكانيات المعاملات الاضافية التي قد لا تحتاجها مياه المجاري غير الصناعية • وكذلك فان هذه المخلفات لا تكون دائمية ، اي بمعنى انها متقطعة وتؤدي الى زيادة حمولة معاملة مياه المجاري في وقت اضافتها اليها ، علاوة على عدم امكانية الاحتفاظ ببعض الاحياء المجهرية الطبيعية الخاصة بتحليل هذه المكونات ما دامت اضافة مياه مخلفات التخمر تكون متقطعة • وأخيرا فان السلطات المسئولة قد تشترط اجراء نوع من المعاملة المبدئية لمخلفات التخمر قبل طرحها مع مياه المجاري العامة •

2 . هدف معاملة مخلفات التخمر Aim of Waste Treatment

ان هدف المعاملة البيولوجية للمياه المتخلفة هو استخدام أحياء مجهرية تسبب اكسدة كاملة لكل المكونات العضوية للمياه المتخلفة الى ثاني أوكسيد الكربون والماء • وتبعا لطريقة المعاملة المستخدمة ، فان الاملاح اللاعضوية الموجودة اساسا في المياه المتخلفة أو الناشئة خلال معاملة المخلفات تخضع ايضا للاكسدة ، اذا كانت هذه الاكسدة ممكنة • وكنتيجة لهذه العمليات التأكسدية المختلفة ، يجب ان تحتوي المياه المتدفقه من هذه المعاملة على كميات صغيرة جدا من المادة العضوية غير المتحللة تماما ، ولكنها قد تحتوي على كميات جديرة بالاعتبار من المواد اللاعضوية كالكبريتات والفوسفات والنترات أو الامونيا وبصرف النظر عن مكونات هذه المياه فانها يجب أن تكون قادرة على دعم نمو كبير للاحياء المجهرية ذاتية التغذية أو غير ذاتية التغذية وبضمنها الطحالب، بحيث يمكن اضافة الماء المتبقي الى مصادر المياه بدون ان تسبب نموا للاحياء المجهرية اكثر من الحد الادنى • وبالتالي فان المياه المتخلفة وغير كاملة المعاملة البيولوجية عند طرحها في الجداول او في اي مصدر مائي تكون معرضة لاكسدة مكيروبية اضافية للمادة العضوية وينتج عنها انخفاض في مستوى الاوكسجين المذاب في الماء • ويشجع هذا النقص في الاوكسين المذاب انواعا غير مرغوبة من الاسماك وفي الحالات الشديدة الاسماك القاتلة وبعض صور الحياة المائية العالية ، كما يسبب حدوث ظروف لا هوائية تنتج عنها روائح كريهة • وتركد الجوامد المتبقية في المياه المتخلفة غير كاملة المعاملة في قاع الجدول او البحيرة وتسبب تغيرات غير مرغوبة في انواع الاحياء المجهرية التي تعيش في القاع •

وتؤدي الاملاح اللاعضوية المتأكسدة والموجودة في المياه المتخلفة الكاملة المعاملة وغير كاملة المعاملة الى مشاكل اضافية بالنسبة للمياه الطبيعية التي تستلم هذه المياه المعاملة ٠ فالفوسفات والنترات والى بعض المدى الكبريتات والامونيا واملاح أخرى تعد مواد تسميد جيدة وتشجع نمو الاشنات والادغال المائية وهذه حالة غير جيدة وغير مفيدة بالنسبة لمظهر أو رائحة جسم الماء ٠ وتستخدم هذه النباتات الاوكسجين المذاب في الليل عندما لا يحدث تخليق ضوئي ، وكذلك فان خلايا انسجتها قد تتحلل في بعض الاحيان وهذا يؤدي الى احتياجات اضافية للاوكسجين المذاب الموجود في المياه ٠

3 . الاحتياج للاوكسجين البيولوجي او الكيمياوي

Biological or Chemical Oxygen Demand

كما ذكرنا ، فان مخلفات الصناعات التخمرية كغيرها من الصناعات الاخرى تحتوي عددا كبيرا من المركبات العضوية التي تتفاوت في قابليتها للتأكسد بين مركبات بسيطة سهلة التأكسد الى مركبات معقدة يصعب تأكسدها او تحللها ٠

ويقاس مستوى المادة العضوية القابلة للتأكسد والموجودة في المخلفات المائية الصناعية او البلدية بصورة الاحتياج للاوكسجين البيولوجي (BOD) Biological Oxygen Demand أو الاحتياج للاوكسجين الكيمياوي (COD) Chemical Oxygen Demand ٠

ويقصد بالاحتياج للاوكسجين البيولوجي (BOD) بأنه عدد مليغرامات الاوكسجين المستهلكة خلال التحلل البيولوجي للمادة العضوية الموجودة في لتر من الماء المتخلف خلال مدة معينة من الزمن (عادة خمسة ايام) وعلى درجة حرارة معينة (عادة 20 ° م) ٠ ويقدر الـ BOD بتخفيف كمية مقاسة من الماء المتخلف باستخدام ماء مشبع بالاوكسجين ثم تحضين الخليط على درجة حرارة 20 ° م ، وبنفس الوقت يجري تقدير خال Control باستخدام تخفيف الماء لوحده ٠ وبعد 5 أيام يقاس الاوكسجين المتبقي فيكلا النموذجين ، والفرق بين القراءتين يمثل كمية الاوكسجين المستهلكة من قبل الماء المتخلف ، ويحسب ليعبر عنه في صورة أجزاء بالمليون منالاوكسجين المأخوذ منقبل الماء المتخلف ٠

ولاجراء هذا التقدير ، يجب تلقيح الماء المتخلف بمياه المجاريأو بالوحل المنشط ،

او بمزارع نقية أو مختلطة ، أو بأي مصدر للاحياء المجهرية يعرف بقدرته في التأقلم على مثل هذه المادة المتخلفة ·

ويقصد باحتياج للاوكسجين **الكيمياوي COD** عدد المليغرامات من الاوكسجين لكل لتر من الماء المتخلف الذي يستهلك خلال أكسدة المادة العضوية بواسطة محلول ثنائي الكرومات المحمض الساخن · وتبدو هذه الطريقة من الوهلة الاولى بكونها غير بيولوجية ولا تعطي صورة حقيقية لسهولة تحليل المادة العضوية أثناء المعاملة البيولوجية للمخلفات ، لذلك فانها تستخدم للمقارنة مع نتائج الـ **BOD** لانواع معينة من المياه المتخلفة ·

ان تقدير الـ **BOD** والـ **COD** يمكن اجراؤه في اية مرحلة من مراحل معاملة المخلفات الصناعية والعامة وذلك للتأكد من كفاءة المعاملة او من حمولة المادة العضوية القابلة للتحلل والتي لا تزال موجودة ·

ومن الواضح أن معاملة المياه المتخلفة هي عملية تخمر حقيقية ، بالرغم من عدم استخدام مزارع نقية من الاحياء المجهرية في التخمر ، وانما تستخدم الاحياء المجهرية الموجودة طبيعيا في المياه المتخلفة · ويسمح لهذه الاحياء ان تصبح غنية بمكونات المجموع الميكروبي الطبيعي والتي تكون اكثر فاعلية ونشاطا في تحليل المادة العضوية ·

وتشمل هذه الاحياء ، البكتريا غير ذاتية التغذية **Heterotrophs** ولمدى معين بعض الاكتينومايستيات والفطريات · وايضا فأن البروتوزا تكون فعالة جدا في هدم المادة العضوية · اما البكتريا ذاتية التغذية **Autotrophs** وبالرغم من عدم قدرتها على هدم المادة العضوية الا انها تكون فعالة ، وبالتالي فأن الامونيا والمركبات الكبريتية المختزلة المتحررة من المواد البروتينية والمخلفات الاخرى تتأكسد بسرعة الى النترات والكبريتات بواسطة هذه الاحياء المجهرية · وتكون البكتريا اللاهوائية في أحواض الهضم اللاهوائي فعالة في هدم المادة العضوية ، وخصوصا المادة العضوية الاكثر مقاومة · وتعطي نشاطات هذه البكتريا جزيئات عضوية بسيطة كالاحماض والكحولات والجليسرول والامينات ونواتج أخرى للايض

اللاهوائي بالاضافة الى نواتـج غازيـة مثـل ثاني اوكسـيد الكـربون والامونيا والهيدروجين والمثيان وكبريتيد الهيدروجين • وعلى أية حال ، فأنه تحت الظروف المثالية ، تستخدم البكتريا المنتجة للميثان معظم الجزيئات العضوية البسيطة الناتجة من النشاطات الايضية لاحياء لاهوائية أخرى معطية ثاني أوكسيد الكربون والميثان بحيث تصبح هذه الغازات النواتج الغازية الرئيسة للتحلل اللاهوائي للمادة العضوية •

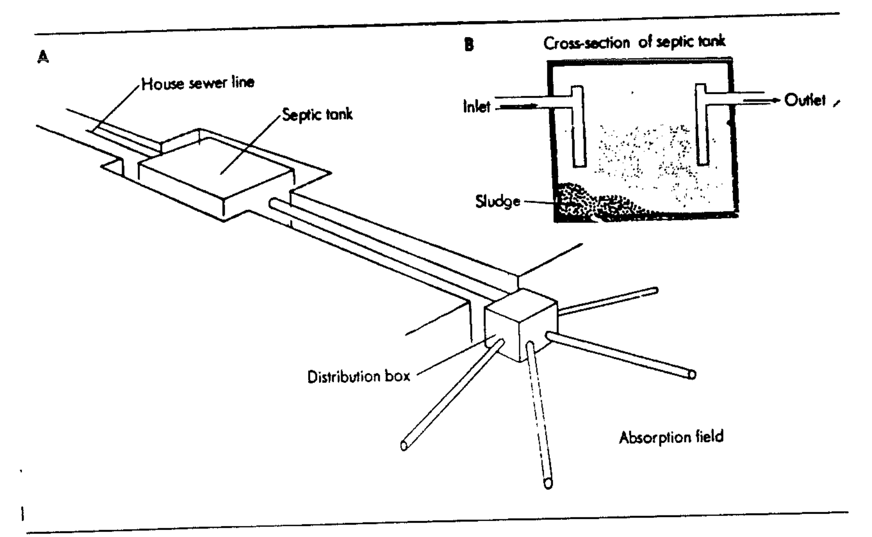
4. طرق التخلص من المخلفات Procedures for Waste Disposal

هناك طرق عديدة لمعاملة المخلفات العامة والصناعية ، هذه الطـرق تختلف تبعا لنوع وكمية المخلفات المراد معاملتها • وقد تتضمن هذه الطرق اتباع معاملة مفردة أو مزج عدد من المعاملات المختلفة • وعموما يمكن تقسيمها الى طرق هضم المادة العضوية الهوائية واللاهوائية •

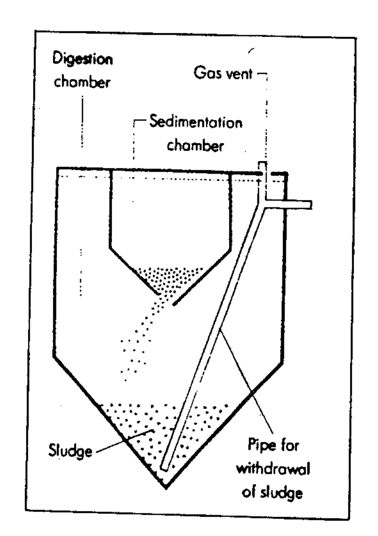
4.1. طرق الهضم اللاهوائية :

وهذه تعتمد على استخدام أحواض لاهوائية Anaerobic Tanks مختلفـة لانواع اذ يتم فيها تركيد وتحلل وتخمر المادة العضوية وقد يعقب ذلك فيما بعد نوع من المعاملة الهوائية • ومن امثلة هـذه الاحـواض هـي احـواض التعفن Septic Tanks واحواض ايمهوف Imhoff Tanks واحواض هضم الوحـل Sludge Digestion Tanks • تستخدم هذه الاحواض لهدم المـواد العضوية البسيطة او المعقدة الى جزئيات عضوية ابسط وغازات تخمر • وقد تستخدم مع اية معاملة اولية او بدونها في حوض التركيد الابتدائي للمياه او المواد المتخلفة •

وحوض التعفن Septic Tank (الشكل 1.13) هو حوض صغير مغلق له فتحة تهوية لهروب غازات التخمر وليس له استخدام كبير في الصناعة في الوقت الحاضر • والمادة العضوية الاكثر مقاومة والتي تصبح مثبتة خلال التخمر وتعـد نوعا ما مقاومة لهدم اخر بواسطة الاحياء المجهرية اللاهوائية ، تتجمع كوحل فـي قاع الحوض ، حيث تؤخذ وتخفف وتطحن ومن ثم تستخدم في التربة كسماد في حين تبقى المياه المتدفقة من حوض التعفن هذا محتوية على كلا المركبات العضوية الذائبة والمعلقة القادرة على دعم نمو الاحياء المجهرية الهوائية غير ذاتية التغذية



الشكل (1.13) . تصميم لحوض التعفن الخاص بالتخلص من المخلفات .
(حيث A : التصميم الاجمالي للنظام و B : مقطع عرضي للحوض)

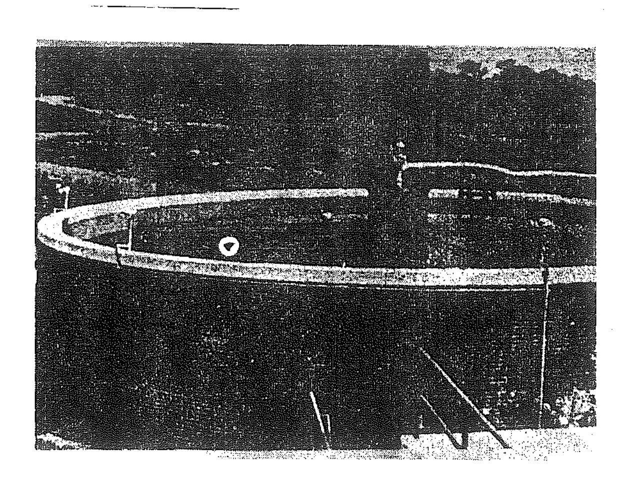


شكل (2.13) حوض ايمهوف ذو الحجرة المزدوجة

وبالتالي فان هذه المياه لا يمكن اضافتها الى جسم الماء الرئيسي في الانهار او البحيرات . لذلك يجب ان يعامل هذا الماء المتدفق معاملة اضافية بواسطة الاكسدة الميكروبية الهوائية ، وغالبا ما ينشر على التربة أو الرمل ، رغم أن ذلك يؤدي الى خفض سريع في مسامية الرمل بواسطة الجوامد المعلقة في الماء .

ويختلف حوض ايمهوف Imhoff Tank (الشكل 2.13) عن حوض التعفن في تصميمه وحجمه ولكنه يعمل بنفس الطريقة وبالتالي فانه قليل الاستخدام في وقتنا الحاضر في المعاملة البيولوجية للمياه المتخلفة . وكذلك يؤخذ الوحل المثبت والناتج من حوض ايمهوف ويخفف ليستخدم كسماد . ومع ذلك تكون المياه المتدفقة بكميات كبيرة جدا بحيث لا يمكن اضافتها للتربة ، لذا فانها تحتاج الى معاملة بيولوجية هوائية أخرى كتلك المتبعة في المرشح البطيء التقطر Trikling Filter .

اما حوض هضم الوحل Sludge Digestion Tank (الشكل 3.13) فانه يعمل بنفس طريقة حوض ايمهوف ولكن بكفاءة أعلى ، ويستخدم للهدم أو الهضم اللاهوائي للمخلفات المترسبة أو الطافية والتي فصلت عن المياه المختلفة الخاضعة للمعاملة الهوائية . ويسخن حوض هضم الوحل للحفاظ على درجة حرار



شكل (3.13) . حوض هضم الوحل لا هوائيا

ثابتة كما تمزج مكونات الحوض • ويطفو رأس الحوض على الماء ليلائم التغيرات في أحجام السائل وليساعد في المحافظة على الظروف اللاهوائية • ويتم جمع غازات التخمر ، المتالفة أساسا من الميثان ، من أحواض هضم الوحل وتحرق عند استخدامها كوقود • في حين يؤخذ الوحل المهضوم والذي تم تثبيته ويخفف لاستخدامه كسماد •

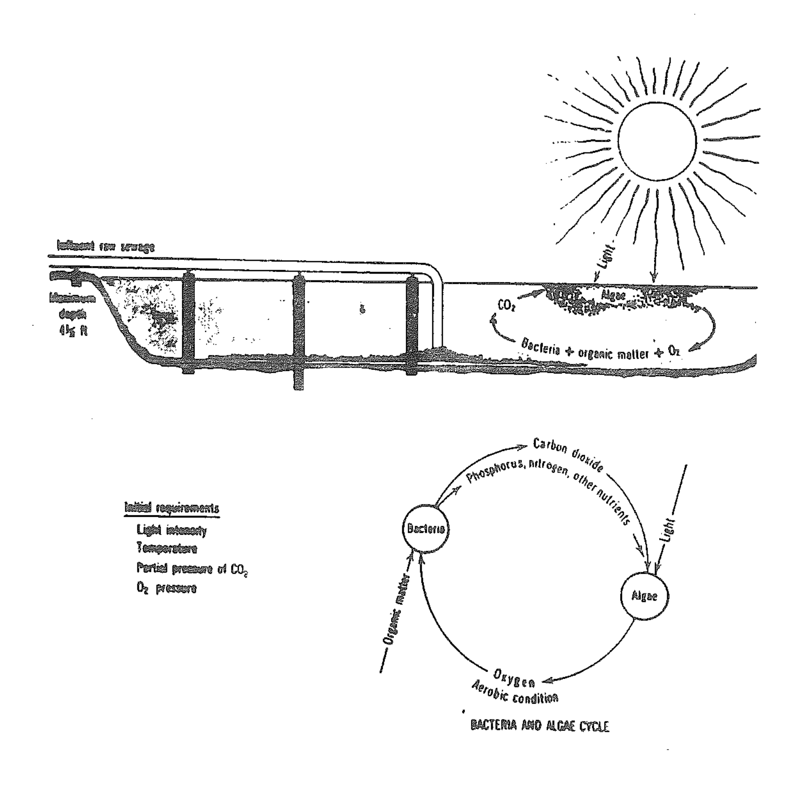
2.4 طرق الهضم الهوائية

في هذه الطرق تعرض المخلفات أو المياه المتخلفة الى تهوية تتفاوت بين معتدلة الى عالية للحفاظ على تأيض هوائي نشط لتلك الاحياء المجهرية المحللة للمادة العضوية المتخلفة • وكنتيجة لاستخدام أحياء مجهرية هوائية فان المادة العضوية المتخلفة تتحلل تماما وبسرعة أكبر من تلك المتحصل عليها بواسطة الاحياء المجهرية اللاهوائية •

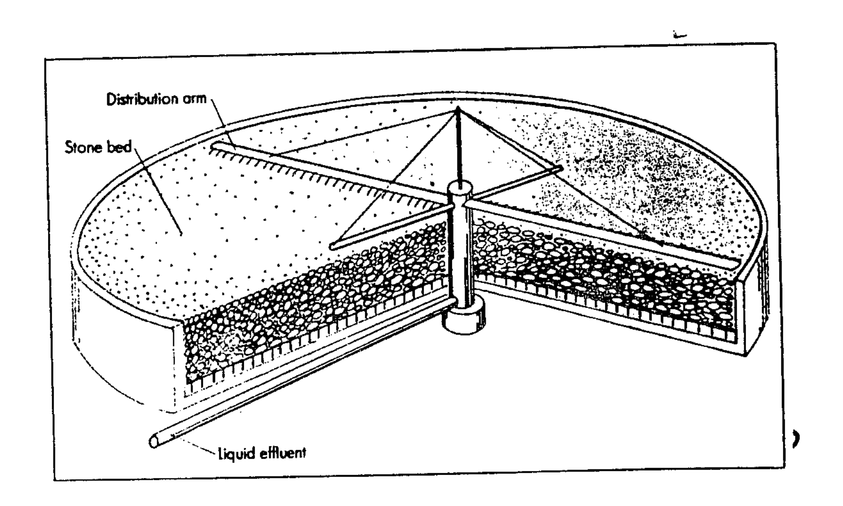
وعادة تجري هذه المعاملة الهوائية للمخلفات الصناعية او العامة باحد نظامين هما : المرشحات البطيئة التقطر Trikling Filters او الوحل المنشط Activated Sludge , وان كانت طريقة برك الاكسدة Oxidation Ponds تستخدم في بعض الاحيان •

ان بركة الاكسدة Oxidation Pond (أو بركة تثبيت المخلفات) كما هو مبين في الشكل (4.13)
هي جسم مائي كبير ضحل عمقه يتراوح بين 60 — 120 سم يتم فيه افراغ المياه المتخلفة في نقطة مفردة عند حافته أو وسطه على سبيل المثال • وتعمل الرياح على مزج محتويات هذا الحوض الضحل، وبالتالي يكون الاوكسجين متيسرا للاحياء المجهرية بواسطة الانتشار من الهواء الى المياه الضحلة وكنتيجة لعملية التخليق الضوئي التي تقوم بها الاشنات • ويتم افراغ المياه المتدفقة من هذه البرك في جدول او في سلسلة من برك الاكسدة المتتالية ، ولذلك يجب تنظيف هذه البرك على فترات لازالة الجوامد التي تتجمع او تتكدس في القعر • والى وقتنا الحاضر تستخدم هذه البرك أساسا في المعاملات المحدودة النطاق لمياه المجاري والمخلفات الصناعية في المناطق التي تتيسر فيها أراضي رخيصة •

بينما يستخدم في المرشح البطيء التقطير Trickling Filter كما في الشكل (5.13) طبقة من الصخور الخشنة أو الكبيرة الحجم علاوة على بعض الصخور الفردية ذات أقطار تتراوح بين 5—10 سم ويتراوح عمق طبقة الصخر بين 2—3 متر ٠ وترش المياه المتخلفة فوق طبقة الصخر على فترات متقطعة وباستمرار باستخدام فتحات ثابتة fixed nozzles أو فتحات مثبتة على ذراع



الشكل (4.13) . التخلص من المخلفات بواسطة طريقة بركة تثبيت المخلفات ٠



الشكل (5.13). مقطع لمرشح بطيء التقطر Trickling Filter

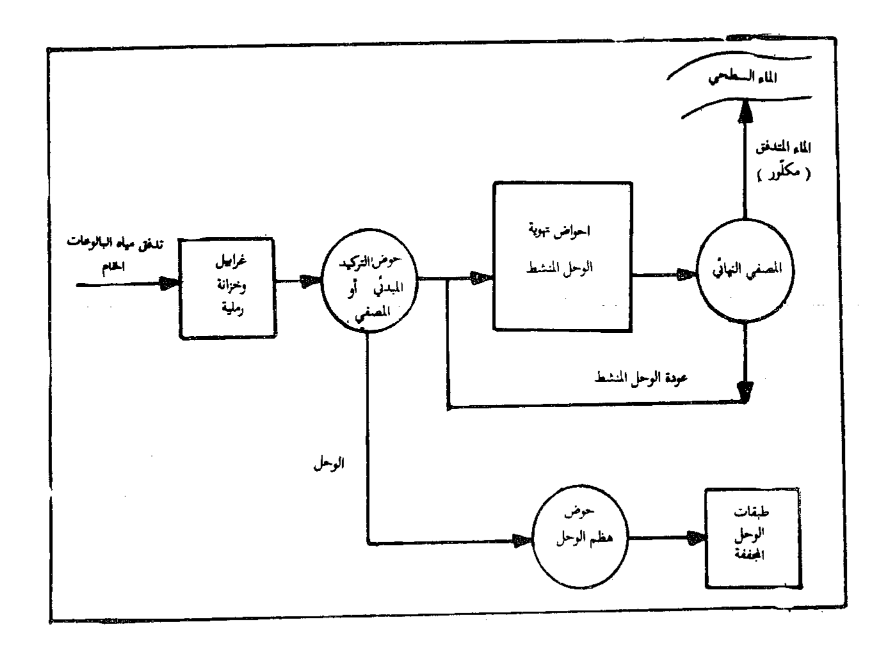
(يظهر في الشكل ذراع التوزيع distribution arm التي توزع المخلفات السائلة ، وطبقة المرشح التي يتخللها السائل stone bed , وأخيرا مجرى تجمع السائل المترشح liquid effleut)

يدور افقيا • وقد تتم تهوية المياه قبل رشها بالرغم من حدوث بعض التهوية خلال عملية الرش • وتلتصق الاحياء المجهرية بالصخور وتنمو على سطحها مكونة طبقة رقيقة لزجة من الخلايا الميكروبية • ويتألف هذا النمو بالدرجة الرئيسة من البكتريا غير ذاتية التغذية وذاتية التغذية والبروتوزوا • وتقوم هذه الاحياء بمهاجمة المادة العضوية الفردية أو الذائبة في المياه المتخلفة مع ترشيح الماء الى الاسفل خلال طبقة الصخر • لذلك يجب الحفاظ على الظروف الهوائية في المرشح البطيء التقطر حتى في قاع المرشح • وهكذا فان هذا المرشح يتشبع بالماء باستمرار ويصبح لا هوائيا بسرعة بسبب احتياجات الاحياء المجهرية العالية للاوكسجين • وفي بعض الاحيان نتيجة لطول فترة استخدام المرشح فان النمو الميكروبي ينسلخ من الصخور ويظهر معلقا في المياه المتدفقة من قاع المرشح • ولمعالجة ذلك فان المياه المتدفقة من المرشح تمرر ببطء على حوض تركيد نهائي لازالة الخلايا الميكروبية المنسلخة أو أية بقايا أخرى قبل معاملتها بالكلور والتخلص منها في جدول أو أي جسم مائي اخر •

اما طريقة الوحل المنشط Activated Sludge فانها تعد من الانظمة العالية الكفاءة للمعاملة البيولوجية الهوائية للمخلفات العامة والصناعية • ومياه البالوعات أوالمجاري هي محلول مائي مخفف للمواد العضوية وغير العضوية المحتوية على جوامد معلقة سوية مع مجموع مختلط من الاحياء المجهرية الاتية من الفائط البشري والماء المترشح • وعادة يكون الهدم والتحطيم الميكروبيولوجي لليوريا الى امونيا وثاني اوكسيد الكربون تاما تقريبا قبل ان تصل مياه البالوعات الى مصنع المعاملة او المعالجة • وتحدد نسبة المادة العضوية الى النتروجين والى الفوسفور في المخلفات الى درجة كبيرة فيما اذا كانت هذه المخلفات سهلة الانقياد للمعاملة البيولوجية • لذلك فان نسبة BOD : الفوسفور وكذلك نسبة BOD : النتروجين قدرها 1 : 150 , 1 : 30 على التوالي تعد مفضلة ويوصى بها للمعاملة بواسطة طريقة الوحل المنشط •

وتبدأ معاملة المياه المتخلفة بامرارها على غرابيل كبيرة لازالة المواد العالقة الكبيرة الحجم واي حطام موجود في هذه المياه (الشكل 6.13) قبل دخولها مصنع المعاملة • ويتم سحق الجوامد المفصولة قبل اعادة دخولها الى الجدول الرئيس للمياه

المتخلفة وبعد ذلك تمرر خلال خزانة رملية خشنة لترسيب الرمـــل والحبيبــات الخشنة وجوامد المعادن الثقيلة · ويمرر معلق الجوامد الدقيقة والمواد الذائبة الى حوض تركيد ابتدائي لفترة قصيرة من الزمن وذلك لترسيب الدقائق الثقيلة كوحل ويزال الوحل الخام دوريا من حوض الترسيب الى حوض التخمير اللاهوائي بواسطة الاحياء المجهرية اللاهوائية (حوض هضم الوحل) حيث يعامل هناك على حـدة · اما السائل الرائق فانه يدخل الى حوض التهوية المثبتة حالته الغذائية ، اذا لـزم



الشكل (6.13) . رسم تخطيطي لمصنع معالجة المخلفات بطريقة الوحل المنشط ·

الامر ، باضافة النتروجين والفوسفات او اي مادة غذائيةضرورية اخرىقبلمزجه بلقاح من الوحل المنشط · وهذا اللقاح هو كتلة متلبدة floc تتالف من خلايـــا مجموع مختلط من الاحياء المجهرية واساسا بكتريا هلامية نمت تحت ظروف هوائية

حيث تستخدم لبدء التخمر الرئيس تحت الظروف الهوائية ، ويفضل أن يكون ذلك بمساعدة تقليب ميكانيكي وتهوية اختيارية ٠

ويجب ان تكون BOD للمياه المتخلفة الداخلة الى حوض التهوية محددة بمستو لينسجم مع معدل الامداد من الاوكسجين المذاب ٠ لذلك فان معلقات متخلفة لهاقيم BOD تصل لغاية 3000—5000 ملغم / لتر تستخدم دائما في هذه العملية ٠ ولكن المزج السريع للمادة المتخلفة الداخلة الى حوض التهوية تكون مفيدة في المحافظة على ظروف تخمر منتظمة ٠

يلي ذلك نمو سريع للمجموع الميكروبي يصاحبه ازالة المادة العضوية الذائبة وغير الذائبة بواسطة الاكسدة وبواسطة الاندماج بالمواد التركيبية او المخزونة للخلايا وبواسطة الالتصاق على الكتل المتلبدة ٠ ودائما يصاحب اطالة فترة التهوية تنفس مواد التفاعل الخلوية بحيث يبدأ التحلل الذاتي Autolysis والتي تكون محصلته خفض المجموع الميكروبي ٠ ويسبب تكوين الزبد او الرغاوي التي تعود اساسا الى المواد البروتينية في المياه المتخلفة بعض المشاكل خلال هذه المرحلة ٠

وبعد ذلك تدخل المياه المتدفقة الى حوض تركيد ثانوي حيث يحدث ترسيب للوحل المثبت ٠ وما ان يعامل المحلول الرائق الذي يترك حوض التركيد الثانوي بواسطة الكلور او ان تتم تهويته ثانية قبل التخلص منه كمحلول واطيء الـ BOD الى المياه السطحية في الجداول او الانهار او البحيرات ٠

ان حوض التهوية السابق توضيحه في نظام الوحل المنشط يستقبل حمولة كبيرة جدا من المواد العضوية القابلة للتحلل عند مدخله ، وهذه المواد العضوية تتهدم بدرجة كبيرة في الوقت الذي تصل فيه المياه المتدفقة النهاية الاخرى من الحوض ٠ وكنتيجة لذلك فان الاحتياج للاوكسجين المذاب يكون أكبر في بداية الحوض منه في نهايته وبالتالي فان الاحياء المجهرية عند طرف خروج المياه المتدفقة تكون من الناحية الايضية أقل نشاطا وفاعلية ٠ ويمكن تصحيح هذا الوضع في نظام المزج التام Complete Mixing للوحل المنشط ٠ ويختلف هذا النظام عن نظام الوحل المنشط السابق شرحه في أن الماء المتخلف وبدون امراره خلال حوض التركيد الابتدائي يستخدم في الحال خلال مياه الجوار الى حوض التهوية ٠

وهذا يؤدي الى احتياج منتظم للاوكسجين المذاب خلال المياه بحيث يحافظ على معظم خلايا الاحياء المجهرية في حالة فسيولوجية متماثلة . ويكون مثل هذا النظام اكثر ثباتا ، وقادرا على معالجة التذبذبات الكبيرة في الحمولة ، وله قابلية أفضل في تهديم المركبات العضوية السامة والقابلة للتحلل . الا أنه في نفس الوقت تتكدس كميات كبيرة من الوحل المنشط في هذا النوع من الاحواض وكذلك قد لا تتأكسد المركبات اللاعضوية تماما .

5 . بعض الاعتبارات المهمة في طرق التخلص من المخلفات

لا تزال طرق معاملة المخلفات الصناعية والعامة دون المستوى المطلوب . لذلك ينبغي السيطرة عليها بعناية لكونها تظهر أخطاء مشابهة لتلك العمليات الميكروبية . وعلى سبيل المثال ، تتضمن الاحياء المجهرية النشطة مجموعا ميكروبيا طبيعيا وبالتالي يمكن لهذا المجموع ان يتذبذب بصورة كبيرة في تركيبه النسبي .

ومن الواضح ، أن بعض الاحياء المجهرية تكون اكثر نشاطا وفاعلية من أحياء اخرى في تحليل المواد المتخلفة .

وفي هذه الحالة يجب مراقبة الـ pH خلال المعاملة اذ أنه يؤثر في أنواع الاحياء المجهرية ونشاطاتها في تحليل المادة العضوية . وأيضا ، باستثناء أحواض هضم الوحل ، لا يمكن التحكم بدرجة حرارة التحضين كما هو الحال في التخمر الصناعي وذلك لكون امكانيات معاملة الماء المتخلف كبيرة ومعرضة للجو . وبالتالي من الضروري اتباع أكثر من طريقة واحدة من طرق معاملة المخلفات أو استخدام أحواض احتفاظ Holding Tanks عندما تؤدي التغيرات في الجو أو في النشاط الميكروبي أو في حمولة نظام المعاملة الى خفض او عدم كفاءة معاملة المياه المتخلفة .

ان المخلفات الصناعية أو العامة التي يكون تحللها البيولوجي ضعيفا او أن تكون سامة للاحياء المجهرية تحدث مشاكل دائمية وتحتاج الى المزيد من الدراسة . وكذلك تحتاج السمة أو القدرة التسميدية للمياه المتدفقة والناتجة من معاملة المخلفات الى دراسات من أجل استخدام هذه المياه بصورة اكثر كفاءة بدلا من أن تسبب في

نمو الادغال المائية والطحالب في الاجسام الطبيعية للماء ۰ وكحل جزئي ، تجرى دراسات مختلفة لتحديد مدى امكانية استخدام هذه المياه في ري الاراضي الزراعية والغابات ۰ وكذلك يجب عمل دراسات اضافية تتضمن ازالة الفوسفات من هذه المياه بواسطة المعاملة الكيمياوية الثلثية ، ومعاملة كيمياوية وبيولوجية مندمجة ۰ واستخدام برك الاشنات في ازالة هذه الاملاح ۰

ويبين الجدول (1.13) عملية الهدم الميكروبي للمكونات العضوية المختلفة الموجودة في المياه المتخلفة والتي ينبغي معالجتها قبل التخلص منها ۰ في حين يوضح الجدول (2.13) مقارنة لكفاءة كل طريقة من طرق معاملة المياه المتخلفة ۰

الجدول (1.13)

مخطط عام لعملية الهدم الميكروبي للمكونات العضوية في المياه المتخلفة

SUBSTRATES	ENZYMES OF MICROORGANISMS →	REPRESENTATIVE END PRODUCTS	
		Anaerobic Conditions	Aerobic Conditions
Proteins and other organic nitrogen compounds		Amino acids	Amino acids
		Ammonia	Ammonia → nitrites → nitrates
		Hydrogen sulfide	Hydrogen sulfide → sulfuric acid
		Methane	Alcohols } → $CO_2 + H_2O$
		Carbon dioxide	Organic acids } → $CO_2 + H_2O$
		Hydrogen	
		Alcohols	
		Organic acids	
		Indole	
Carbohydrates		Carbon dioxide	Alcohols } → $CO_2 + H_2O$
		Hydrogen	Fatty acids } → $CO_2 + H_2O$
		Alcohols	
		Fatty acids	
		Neutral compounds	
Fats and related substances		Fatty acids + glycerol	Alcohols } → $CO_2 + H_2O$
		Carbon dioxide	Lower fatty acids } → $CO_2 + H_2O$
		Hydrogen	
		Alcohols	
		Lower fatty acids	

الجدول (2.13)

مقارنة لكفاءة الطرق المختلفة لمعاملة المياه المتخلفة ٠

METHOD	PERCENTAGE OF REMOVAL OF SUSPENDED SOLIDS	GALLONS OF SLUDGE PER MILLION GALLONS OF SEWAGE	PERCENTAGE OF REMOVAL OF		
			Bacteria	BOD	Oxygen Consumed
Plain sedimentation	40−95	1,000−5,000	40−75	30−35	
Chemical precipitation	75−95	5,000−10,000	80−90	60−80	
Septic tank	40−75	500−1,500	40−75	25−65	
Imhoff tank	35−80	250−750	40−75	25−65	20−50
Intermittent sand filter	95−98		98−99+	70−96	70−95
Contact bed	55−90		50−75	60−80	30−55
Trickling filter	0−80	250−750	70−85	60−90	35−60
Activated sludge	70−97	10,000−30,000	95−99+	70−96	50−85



الفصل الرابع عشر

اقتصاديات التخمر Fermentation Economics

---

1. مقدمة
2. حاجة السوق للناتج التخمري
3. تكاليف الانتاج
   - 1.3 تكاليف بيئات الانتاج
   - 2.3 تكاليف العمال
   - 3.3 تكاليف فترة التخمر
   - 4.3 تكاليف التلوث والتعقيم
   - 5.3 تكاليف استرجاع الناتج
   - 6.3 تكاليف نقاوة الناتج
   - 7.3 تكاليف النفقات العامة
   - 8.3 تكاليف التخلص من المخلفات
   - 9.3 تكاليف الابحاث
   - 10.3 تكاليف النفقات الرئيسة
   - 11.3 وضع براءة الاكتشاف (حق الامتياز)
4. تصميم العملية التخمرية



تعد التخمرات الصناعية من المشاريع التجارية المدرة للمال والمنافسة فيها شديدة وكبيرة ٠ وتقوم اكثر من مؤسسة صناعية باجراء نفس التخمر وحتى باستخدام نفس الكائن الحي المجهري ٠ وكذلك قد يدخل ناتج التخمر الى المنافسة في السوق المفتوحة مع ناتج مماثل منتج بعملية غير تخمرية أو ميكروبية ٠ ولكي يكون التخمر الصناعي منافسا ينبغي ان يعطي انتاجا عاليا باقل كلفة ممكنة وكذلك يجب ان يكون استرجاع النواتج بصورة قابلة للبيع بطريقة عالية الكفاءة ولا تضيف كثيرا الى تكاليف التخمر ٠

وتعد القدرة على انتاج منتوج تخمري معين بكميات كبيرة جزءا من متطلبات نجاح العملية التخمرية التجارية فحسب ٠ لذلك ينبغي ان يباع الناتج بسعر معين يفي بمستلزمات استرجاع تكاليف انتاجه زائدا ربحا معقولا ٠ ولبيع اي ناتج تخمري لا بد من وجود طلب معين او سوق معينة لهذا الناتج ٠ ويبرز هنا احتمالان ، الاول يتعلق بالوجود الفعلي لسوق طلب هذا الناتج بدليل ان نفس او اي ناتج اخر شبيه به سبق بيعه من قبل منتجين اخرين ٠ والثاني ان الناتج التخمري حديث الاكتشاف والذي لم يسبق عرضه وبيعه تجاريا (مثلا مضاد حيوي جديد أو مادة منكهة للغذاء) سيحتاج الى ايجاد سوق له ٠

اذن كيف يمكن لناتج تخمري أن يجد طريقه للنجاح واستخدام ويدخل المنافسة مع نواتج اخرى مماثلة له سواء كانت منتجة بطريق تخمري او غير تخمري ؟

الاجابة على هذا السؤال لا بد ان نضع نصب أعيننا عدة اعتبارات مهمة منها حاجة السوق لذلك الناتج وتكاليف التخمر المختلفة سواء تلك المتعلقة بعملية التخمر نفسها او بالبيئات المستخدمة او بطرق الحصول على الناتج ووسائل المحافظة عليه وطرق تطويره بالاضافة الى اعتبارات اخرى ٠

2 . حاجة السوق للناتج التخمري

ان حاجة السوق تختلف من ناتج لاخر وحسب فائدته واستخداماته ٠ ففي

بعض الاحيان لا يمكن طرح ناتج تخمري معين في السوق اذ كانت استخداماته قليلة وبالتالي سيكون الطلب عليه قليلا او غير موجود • ومن الواضح ان مثل هذا الناتج غالبا ما يصعب تغطية براءة اكتشافه لقلة فائدته • وبالتالي فان نواتج تخمر من هذا النوع يتم دراستها بتوسع من قبل الشركة التخمرية المنتجة لايجاد استخدامات جديدة • وقد ترسل عينات من هذه النواتج الى شركات اخرى على اساس تجريبي للاختبار ولايجاد مدى امكانية اكتشاف او تطوير طرق لاستخدام هذه النواتج •

وفي بعض النواتج التخمرية يكون السوق موجودا بالفعل لكون الناتج قد سبق بيعه للجمهور الذي وجد فيه تقبلا • واذا كان بالامكان الحصول على هذا الناتج أما بواسطة التخمر أو بالتخليق الكيمياوي أو بالاستخلاص من مصادر طبيعية ، فمن الواضح أن طرق التخمر ستدخل المنافسة مع الطرق الاخرى • لذلك اذا ارادت مؤسسة صناعية تخمرية دخول السوق بناتج تخمري له مثيل ينتج بطريقة أخرى ، ينبغي أن تكون تكاليف الانتاج واطئة لكي يباع بسعر مقارب أو أقل من السعر السائد في السوق •

وكذلك قد يستخدم ناتج التخمر داخليا بواسطة المؤسسة الصناعية ولا يباع ابدا بصورة مباشرة للجمهور • وعلى سبيل المثال ان شركة تصنع وتبيع الاسبرين ، عليها أن تنتج حامض الساليسيليك بواسطة تخمر النفثالين ، يلي ذلك تحويل كيمياوي لحامض الساليسيليك الى الاسبرين • وكطريقة بديلة ، فقد يباع ناتج التخمر مباشرة الى مؤسسة صناعية أخرى وهي بدورها تقوم بالتحويل الكيمياوي لناتج التخمر قبل بيعه للجمهور •

وأيضا لا يجوز أن يكون ناتج التخمر المعروض في السوق ذا تكاليف عالية لا يتحملها السوق حتى في حالة عدم وجود ناتج مماثل منافس له • فالطلب على نواتج تخمرية معينة قد يعمل على تحميلها أثمانا اعلى كثيرا من الطلب على نواتج تخمرية أخرى • وعلى سبيل المثال تعد المضادات الحيوية للاستخدامات الطبية غالية الثمن مقارنة بالخل المنتج بالتخمر • وهذا برهان على الاختلاف بين ناتج تخمري منتج بكميات قليلة نسبيا ولكن له سعر عال وربح عال بالنسبة للوحدة

المباعة ، وبين ناتج تخمري منتج بكميات كبيرة وبكلف انتاج وسعر بيع وربح منخفض ٠

ولا يغب عن البال أن أي ناتج تخمري قد يكون وحيدا في السوق المحلية وبعيدا عن المنافسة مع النواتج الاخرى وذلك لان بعض الدول تشرع قوانين لحماية انتاجها الوطني لمنع مزاحمة الانتاج المستورد لها ٠ ولكن في السوق الخارجية قد تدخل نواتج تخمرية عديدة من مؤسسات صناعية في دول مختلفة في منافسة شديدة مع بعضها البعض ٠ وهنا تدخل اعتبارات عديدة تحدد من كلفة الناتج التخمري المعروض ، منها أجور العمال وتكاليف الانتاج ومشاكل التضخم التي تختلف من دولة لاخرى ٠

3 . تكاليف الانتاج

يرتبط الوضع الاقتصادي لناتج تخمري معين بتكاليف انتاجه وتوزيعه ٠ ويمكن تصنيف هذه التكاليف الى فئات متعددة منها :ـ

1.3. تكاليف بيئات الانتاج

ان تكاليف بيئات الانتاج تتضمن جزءا مهما من التكاليف الكلية للتخمر الصناعي ٠ وتمتاز بيئات التخمر الصناعي بمحتواها العالي من المواد المحتوية على الكربون والنتروجين ٠ فالمصدر النشوية للبطاطا والحبوب ، والمولاس ، وماء نقيع الذرة ، والدقيق المنزوع الدهن لفول الصويا وبذور القطن والى ما شابه ذلك لها استخدامات كبيرة كمواد غذائية للتخمر ، وهذه المواد عبارة عن نواتج أو نواتج ثانوية زراعية وتكون معرضة لتذبذبات الاسعار المرتبطة بصور العرض والطلب للاقتصاد الزراعي ٠ علاوة على ذلك فان تيسر هذه المواد وأسعارها تتأثر كثيرا بالسياسات الحكومية للاسعار السائدة للمنتجات الزراعية ٠ فاذا أرتفع سعر منتوج زراعي معين مستخدم كمادة أولية للتخمر ، ينبغي بذل كل المحاولات لايجاد بدائل قليلة التكلفة لتحل محله ٠ ولا يغب عن أذهاننا أن استخدام بيئة تخمر بديلة قد يستلزم في بعض الاحيان استخدام كائن حي مجهري مختلف ليقوم بالتخمر ٠

ولا تشكل البيئة ومكوناتها مصدرا وحيدا لاعتبارات الكلفة ، وانما قد تحتاج بعض البيئات الى معاملات أولية لجعلها صالحة للنمو الميكروبي أو لتكديس ناتج التخمر ، وبالتأكيد أن مثل هذه المعاملات تضيف الى كلفة الانتاج • مثلا قد يتطلب الامر ازالة بعض المعادن باستخدام مبادلات أيونية ، وكذلك قد لا تكون المصادر الكربوهيدراتية المعقدة متاحة للكائنات الحية المخمرة للسكريات الاحادية وهذا يستلزم تحويل هذه المصادر الكربوهيدراتية الى صور أبسط أكثر تيسرا للاحياء المجهرية ، وكذلك تعديل الـ pH باستخدام الحامض أو القلوي خلال مراحل الانتاج ، واستخدام وسائل وطرق لمنع تكوين الرغاوي خلال التخمر ، وأخيرا وسائل استرجاع الناتج التخمري •

لذلك يجب اختيار بيئة تخمر مناسبة للحصول على أعلى استرجاع ممكن للناتج التخمري •

2.3 تكاليف العمال

ويقصد بها تكاليف العمالة المبذولة في معالجة المزارع واللقاح والانتاج واسترجاع الناتج والتنقية والحفاظ على عقم الناتج ، والتعبئة ، وانتاج البخار ، وصيانة المعدات ونظافتها ، والسيطرة النوعية والادارة والى ما شابه ذلك • وتتفاوت هذه التكاليف من تخمر لاخر ومن بلد لاخر ، وقد تكون كبيرة في حالة التخمرات التي تستغرق وقتا طويلا •

3.3 تكاليف فترة التخمر

من الواضح أن تكاليف التخمر القصير الامد هي أقل من التخمر الطويل الامد وهذا يعد صحيحا في كلا عمليتي بناء اللقاح والانتاج • اذ يؤدي وقت تخمري قصير الى استخدام معدات التخمر بشكل متكرر في اجراء تخمرات أكثر خلال نفس الفترة الزمنية • وخاصة اذا علمنا أن نهاية تخمر معين يعني تيسر المعدات الملحقة به وبذلك يمكن افراغ حوض التخمر نفسه وتنظيفه لاعادة استخدامه ما دام انشغال هذا الحوض يؤدي الى انشغال كافة المعدات الاخرى وبالتالي لا يمكن اجراء تخمر آخر جديد •

4.3. تكاليف التلوث والتعقيم

ان التلوث بأكثر من الحد الادنى يسبب دائما في تكاليف اضافية للتخمر ،
ما دامت معظم التخمرات تتلف عند حدوث تلوث خطير وبالتالي يجب نبذ او طرح
البيئة • ولكن حدوث تلوث معتدل قد لا يكون خطيرا بدرجة تقضي بنبذ بيئـــة
التخمر ، رغم ان نواتج التخمر قد تتأثر بشكل جدي • وتكــون بعض التخمرات
اكثر عرضة للتلوث من غيرها ومثل هذه التخمرات هي تلك التي تعاني من مشاكل
الرغاوي ، أو فترة تحضين طويلة ، أو منافسة ضعيفة لكائن التخمر مع الملوثات
بالنسبة للمواد الغذائية في البيئة أو ان يكون ناتج التخمر نفسه سهل التهـــدم
أو يتغير كيمياويا بواسطة الاحياء المجهرية الملوثة •

• والتخمرات التي لا تسمح اقتصادياتها بتعقيم البيئة يتم دائمـــا تزويدها
بطريقة معينة بديلة لمقاومة التلوث منها خفض pH البيئة ، أو بمادة تفاعل ذات
قدرة ضعيفة للمهاجمة من قبل الملوثات ، أو معاملة حرارية جزئية وأخيـــرا
استخدام مواد كيمياوية معينة لاعاقة نمو الملوثات • ورغم ان هذه الطرق السابقة
لا تعطي ضمانا كاملا في منع التلوث فانها بالتأكيد تضيف الى كلفة التخمر وبالتالي
يجب وضعها في الاعتبار •

بالاضافة الى ما ذكر ، فان التخمرات التي تستخدم احياء مجهرية غير ثابتة
وراثيا قد تضيف تكاليف مشابهة للتكاليف المسببة بواسطة الملوثات الاخرى •

5.3. تكاليف استرجاع الناتج

ان قدرة أي تخمر على اعطاء ناتج عال وكذلك السماح بالاسترجاع الكفوء
لهذا الناتج تعد من الامور المهمة والرئيسة في اقتصاديات التخمر ، ممـا يسمح
للتخمر بان يحافظ على وضعه التنافسي في السوق المفتوحة • وبالتالي ، ان لم
يكن ناتج التخمر محميا باحتكار براءة الاكتشاف ، فمن المحتمل ان تتطلب المحافظة
على وضع السوق التنافسي الى استمرار برنامج البحث والدراسة من أجل زيادة
نواتج التخمر وطرق الفصل لاسترجاعها •

6.3. تكاليف نقاوة الناتج :

تسوق النواتج التخمرية عـــادة بمستويات نقـاوة مختلفة • فمثلا بعض تحضيرات المضادات الحيوية ينبغي ان تكون على درجة عالية من النقاوة والعقم وخالية من المواد المولدة للحمى Pyrogens • في حيـن ان بعضـــ تحضيرات المضادات الحيـوية تخلط بصورتها الخـام مع الاعلاف وعليـه فانهـا لا تتطلب هذه الدرجه من النقاوة • لذلك فان مستويات النقاوة المطلوبة في الناتج التخمري تضيف الى تكاليف الانتاج كلفا متفاوتة تبعا لدرجة نقاوة الناتج • وهذه التكاليف لا ترتبط فقط بكلفة اجراء الخطوات المختلفة من تنقية الناتج دائما ايضا مع حقيقة وجود فقد بسيط او كبير في ناتج التخمر قد يحدث في كـل خطوة مـن خطوات عملية التنقية •

7.3. تكاليف النفقات العامة

ويشار اليها بالنفقات المبذولة في ادارة الاعمال • وهذه تشمل نفقات الايجار والضرائب ، والتامين ، والاضاءة ، والحرارة ، والحسابات ، ونفقات مكتبية اخرى وانخفاض القوة الشرائية للعملة والى ما يشابه ذلك وينبغي ان تدخل هذه النفقات ضمن التكاليف الكلية لناتج التخمر ، ولكنها لا ترتبط او تتذبذب الى اي مدى مع تخمر معين •

8.3. تكاليف التخلص من المخلفات

تتفاوت التكاليف المصروفة في التخلص من المخلفات كثيرا وتدخل ضـــمن تكاليف ناتج التخمر • وهذه تعتمد اساسا ما اذا كانت المخلفات ستعامل مع المخلفات العامة او ان المصنع نفسه يقوم بمعاملة مخلفاته بنظام خاص مرتبط به : ففـي بعض المناطق لا تسمح السلطات بتصريف هذه المخلفات الصناعية الى مصادر المياه الطبيعية حفاظا على البيئة من التلوث ، لذلك تحكم عملية التصريف والتخلص من هذه المخلفات لوائح وقوانين معينة قد تشترط على المؤسسة الصناعية المنتجة معاملات معينة تضيف تكاليف كبيرة على ناتج التخمر •

وكما سبق ذكره (في الفصل الثالث عشر من هذا الباب) فـــان مخلفات التخمر الفعلي ، ومخلفات عمليات استرجاع الناتج علاوة على مخلفات مياه التنظيف والتبريد ٠

وفي بعض الاحيان قد يتم استرجاع بعض النواتج الثانوية من بيئات التخمر بعد الحصول على الناتج الرئيس ، وهذا الاسترجاع لهذه المواد يقلل من تكاليف الناتج الرئيس ٠ فمثلا يسترجع الرايبوفلاثين من بيئة تخمر الاسيتون ـ البيوتانول او ان الحبوب المستهلكة اثناء الاستخلاص في صناعة البيرة يتم فصلها بالترشيح أو بالطرد المركزي ومن ثم تجفف وتباع للمواشي بينما تفصل الخميرة بعد انتهاء تخمر البيرة وتعامل ببعض المعاملات لازالة المواد المرة منها ومن ثم تستخدم كعلف للحيوانات ٠

9.3. تكاليف الابحاث

تدخل التكاليف المبذولة على الابحاث لايجاد نواتج جديدة او لتطويـــر او تحسين ناتج موجود بالفعل ضمن التكاليف الكلية لناتج التخمر ٠ وايضا تقـــوم المؤسسة الصناعية باجراء ابحاث عديدة للحفاظ على وضعها التنافسي التجـاري لعملية تخمرية معينة ٠

10.3. تكاليف النفقات الرئيسة

قد يحتاج تخمر جديد الى انفاق رأس مال قبل بدء الانتاج التجاري ومن هذه الناحية فان متطلبات نفقات رأس المال ترتبط بمعدات التخمر والامكانيات الاخرى٠ وتكون هذه الاجهزة غالية وتستخدم باستمرار في التخمرات تحت الانتاج ٠ وبالتالي يتطلب التخمر الجديد الى احتلال المعدات الموجودة للتخمرات القائمة او تصميم معدات اضافية ٠ ونفس الشيء يمكن أن يقال عن معدات استرجاع الناتج وتنقيته ٠ وكذلك قد يستلزم التخمر الجديد المتطور تركيب معدات تخمر غير اعتيادية أو حديثة التصميم ومن الواضح ان تركيب مثل هذه المعدات يضيف كثيرا الى تكاليف التخمر وهذا بدوره ينعكس على ناتج التخمر ووضعه في السوق ٠

11.3. وضع براءة الاكتشاف (حق الامتياز)

ان وضع براءة الاكتشاف لعملية تخمرية او لناتج تخمري يؤثر بشكل ملحوظ على العائد أو الربح • وبالتالي فان وضع براءة الاكتشاف يسمح بتحميل كلف عالية على الناتج التخمري مادام السوق يستطيع تحمل ذلك دون النظر الى المنافسة التجارية الكبيرة • لذلك فان الوضع الجيد لبراءة اكتشاف يوفر جهدا أكبر في تكاليف الاسترجاع وفي الحصول على ربح معقول •

وتكون تكاليف الحصول على براءة الاكتشاف منخفضة نسبيا ، ولكنها تصبح مكلفة اذا حدثت مخالفات ، وبالتالي قد يترتب على المخالف تكاليف التضـــرر والقضاء •

في انتاج وتسويق ناتج التخمر • وقد يتم ترخيص براءة الاكتشاف ومنح امتياز استخدامها من قبل شركات اخرى حتى لتلك المنافسة • وقد لا تكون براءة الاكتشاف مربحة لدرجة كبيرة اذا كان ناتج التخمر يشفي بعض الامراض وخاصة السرطانية لذا قد يضع المكتشف سعرا من ناتج التخمر يسمح بالحصول على ربح معين يفـــي بتكاليف اكتشاف وانتاج هذا الناتج •

وفي المقابل قد تكون بعض براءات الاكتشاف قليلة الفائدة لحاملها • اذ قد لا يتهيىء لحامل البراءة رأس المال والامكانات المناسبة لانتاج وتسويق ناتج التخمر ، او ان تكون المادة الاولية للتخمر مكلفة جدا بحيث لا تسمح لحامل البراءة من دخول المنافسة بناتجه في السوق المفتوحة ، أو أن هناك من يقوم بانتاج وتسويق مثـل هذه المواد الاولية ، او من له هذه المواد الاولية كنواتج ثانوية لعمليات اخرى او من يكون وضعه افضل من حامل البراءة في استغلالها • وفي هذه الحالات، فانه مـن الافضل لحامل البراءة أن يرخص أو يجيز براءة الاكتشاف ، أو أن يبيع حقـوق اكتشافه •

لذلك فان تكاليف اكتشاف وتطوير عملية تخمرية تضاف الى كلفة نـاتـــج التخمر •

تقييم العملية التخمرية

يتطلب التقييم الاقتصادي لاية عملية تخمرية تقييم كافة الاعتبارات المتعلقة

بالتخصر تحت ظروف السوق الحالية والمستقبلية • وينبغي أجراء هذا التقييم في وقت مبكر خلال عملية التطوير وعند وقت التقرير بدخول السوق بناتج التخصر المنتج • واخيرا ينبغي اعادة تقييم العملية فيما بعد خلال الانتاج التجاري • ولبلوغ هذه التقييمات من الضروري تقدير التيسر الحالي والمستقبلي وسعر مواد تفاعل التخمر ، وتكاليف العمالة والنفقات العامة ، وطلب السوق والمنافسة ، وامكانيات تحسين الناتج واسترجاعه ، والقدرة والامكانية لاستيفاء حاجة السوق من الناتج وكذلك من الضروري دراسة كل التكاليف الحالية والمستقبلية والربح المرغوب وسعر بيع الناتج الذي يستطيع السوق تحمله • وتوضع كل هذه النقاط في الاعتبار وتستخدم لتقرير مدى امكانية انتاج ناتج التخمر وبيعه بسعر مقبول ويعطي مستوى معينا من الارباح • واذا كانت النتيجة سلبية ، فعليه ينبغي التخلي عن العملية واجراء ابحاث اخرى لجعلها اقتصادية ، او ترخيص او بيع براءة الاكتشاف لمن له القدرة على انتاج وتسويق ناتج التخمر بمستوى مقبول من الربح •

مراجـــع البـــاب الثـــاني

Alexopoulos, C.J. (1962) — Introductory mycology· 2nd ed. John Willey & Sons, Inc., New York.

Alexopoulos, C.J., and Bold, H.C. (1967) — Algae and fungi. Macmillan Press Ltd., NeW York.

Ali Khanian, S.I. (1962) — Induced mutagensis in the selection of microorganisms. Adv. Appl. Microbiol., 4, 1—50.

Allen, L.A. (1964) — The biochemistry of industrial microorganisms. Chem. Ind. May 23, p. 877-880.

American Type Culture Collection (1972) — Catalogue of strains. 10th ed. 312 pp. Rockville, Md. 20852.

Amerine, M.A., and Ough, C.S. (1972) — Recent Advances in enology CRC Critical Review in Food Technology, 2 (4) : 407-515.

Amerine, M.A., and Ough, C.S. (1980) — Method of analysis fo musts and wines. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Bhattacharjee, J.K. (1970) — Microorganisms as potential sources o food. Adv. Appl. Microbiol., 13, 139-161.

Blakebrough, N. (1967) — Biochemical and biological engineering science, Vol. E. Academic Press, London.

Brock, T.D. (1970) — Biology of microorganisms. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New York.

Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (1974) — Bergy's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Bungary, H.R. (1968) — Microbial interactions in continuous culture. Adv. Appl. Microbiol., 10, 269-290.

Burnett, J.H. (1968), — Fundamentals of mycology. St. Martin's Press, New York.

Calam, C.T. (1964) — The selection, improvement and preservation of microorganisms. Prog. Ind. Microbiol., 5, 1—54.

Carr, J.G., Cutting, C.V., and Whiting, G.C. (1975) — Lactic acid bacteria in beverages and food. Academic Press, New York.

Casida, L.E., Jr. (1968) — Industrial microbiology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Chapman, V.J., and Chapman, D.J. (1973) — The algae, 2nd ed. Macmillan Press Ltd., New York.

Commowealth Myccological Institute (1968) — Catalogue of the culture collection of the commonwealth mycological institute, 5th ed. 162 pp. Kew Surrey, England.

Demain, A.L. (1966) — Industrial fermentation and their relation to regulatory mechanisms. Adv. Appl. Microbiol. 8, 1—27.

Edward, V.H. (1969) — The recovery & purification of biochemicals. Adv. Appl. Microbiol, 11, 159-210.

Encyclopaedia Britanica (1979)— The new encyclopaedia britanica, Vol. 1 & 12. Encyclopaedia Britanica Inc., Chicago.

Fisher, L. (1969) — An introduction to gel chromatography. North Holland Pub. Co., Amsterdam, Netherlands.

Food and Agriculture Organization (1974 a) — FAO. Bibliography list, No. 27 — 283 — 74, 24 (4) 12.

Forage, A.J. and Righelato, R.C. (1979) — Biomass from carbohydrates. In "Microbial biomass", (A.H. Rose, ed.) Academic Press, New York.

Fraizer, W.C., and Westhoff, D.C. (1978) — Food microbiology, 3rd ed. McGraw-Hill Book Co., New York.

Gainey, P.T., and Lord, T.H. (1952) — Microbiology of water and sewage. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J.

Gerhardt, P., and Bartlett, M.C. (1959) — Continuous industrial fermentations. Adv. Appl. Microbiol., 1, 215—260.

Grob, R.L. (1977) — Modern practice of gas chromatography. John Wiley, New York.

Guirard, B.M. and Snell, E.E. (1962) — Nutritional requirements of microorganisms. In "The bacteria". (I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier, eds.) Vol. 4, p. 33—93. Academic Press, New York.

Harrison, D.E.F. (2978) — Mixed cultures in industrial fermentation processes. Adv. Appl. Microbiol., 24, 129-164.
Van Nostrand Reinhold Co., New York.

Heckey, R.J. (1961) — Preservation of bacteria by liphilization. Adv. Appl. Microbiol., 3, 1—76.

Heckey, R.J. (1978) — Preservation of microorganisms. Adv. Appl. Microbiol., 24, 1—53.

Heden, G.G. and Starr, M.P. (1964) — Global impacts of applied microbiology : an appraisal. Adv. Appl. Microbiol., 6, 2—26.

Heftemann, E. (1975) — Chromatography : a laboratory hand-book for chromatographic and electrophoretic methods, 3rd ed. Van Nostrand Reinhold Co., New York

Hesseltine, C.W. and Haynes, W.C. (1973) — Sources and management of microorganisms for the development of a fermentation industry. Prog. Ind. Microbiol., 12, 3—46.

Hockenhull, D.J.D. (1975) — The fermentor pilot plant and its aims. Adv. Appl. Microbiol., 19, 187—208.

Hockenhull, D.J.D. (1977) — Information control in fermentation development. Adv. Appl. Microbiol., 21, 125—159.

Horvath, C. (1980) — High performance liquid chromatography, Vol. 1 & 2. Academic Press, New York.

Hutner, S.H. (1972) — Inorganic nutrition. Ann. Rev. Microbiol., 26, 197—232.

Jackson, D.F. (1968) — Algae, man and the environment. Syracuse Univ. Press, Syracuse, New York.

Jay, J.M. (1970) — Modern food microbiology. Van Nostrand Reinhold Co., New York.

Jenning, W. (1980) — Gas chromatography with glass capillary columns. Academic Press, New York.

Joslyn, M.A. (1970) — Method in food analysis : physical, chemical and instrumental methods of analysis, 2nd ed. Academic Press, New York.

Kelly, D.P. (1971) — Autotrophy : Concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Ann. Rev. Microbiol., 25, 177—210.

Lamana, C., and Mallette, M.F. (1965) — Basic bacteriology, 3rd ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Lederbeerg, J., and Lederberg, E.M. (1952) — Replica planting and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol., 63, 399—406.

Lodder, J. (1970) — General classification of the yeasts. In "The yeasts" (J. Lodder, ed.) North-Holland Pub. Co., Amsterdam.

Margalith, P. (1964) — Secondary factors in fermentation processes. Adv. Appl. Microbiol., 6, 69—90.

Maxon, W.D. (1960) — Continuous fermentation. Adv. Appl. Microbiol., 2, 335—349.

McDonald, K.D. (1976) — Second international symposium on the genetics of industrial microorganisms. Academic Press, New York.

McKinney, R.E. (1962) — Microbiology of sanitary engineers. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.

Meyrath, J., and Bayer, K. (1979) — Biomass from whey. In "Microbiol biomass", (A.H. Rose, ed.), Academic Press, New York.

Miller, B.M., and Litsky, W. (1976) — Industrial microbiology, McGraw-Hill Book, Co., New York.

Moat, A.G. (1979) — Microbial physiology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Muggleton, P.W. (1962) — The preservation of cultures. Prog. Ind. Microbiol., 4, 190—214.

Payne, J.W. (1980) — Microorganisms and nitrogen sources. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Pelczar, M.L., and Reid, R.D. (1972) — Microbiology. McGraw-Hill Book, Co., New York.

Peppler, H.J., and Perlman, D. (1979) — Microbial technology, 2nd ed. Vol. 1. Microbial processes. Academic Press, New York.

Peppler, H.J., and Perlman, D. (1979) — Microbial technology, 2nd ed. Vol., 2. Fermentation technology.

Pomerance, Y., and Meloan, C.E. (1971) — Food analysis : theory and practice. AVI Pub. Co., Westport, Conn.

Prescott, G.W. (1968) — The algae : a review. Houghton, Mifflin, Baston.

Prescott, S.C., and Dunn, C.G. (1959) — Industrial microbiology. 3rd ed. McGraw-Hill Book Co., New York.

Rainbow, C., and Rose, A.H. (1963) — Biochemistry of industrial microorganisms. Academic Press, New York.

Rendina, G. (1971) — Experimental methods in modern biochemistry. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

Reusser, F. (1963) — Stability and degeneration of microbial cultures on repeated transfer. Adv. Appl. Microbial., 5, 189—216.

Rhodes, A., and Fletcher, D.L. (1966) — Principles of industrial microbiology, 1st ed. Pergamon Press, Oxford.

Rose, A.H. (1961) — Industrial microbiology. Butterworths, Washington.

Rose, A.H., and Harrison, J.S. (1969) — The yeasts, Vol. 1. Biology of yeasts. Academic Press, New York.

Rose, A.H., and Harrison, J.S. (1970) — The yeasts, Vol. 3. Yeast technology. Academic Press, New York.

Rose, A.H., and Harrison, J.S. (1971) — The yeasts, Vol. 2. Physiology and biochemistry of yeasts. Academic Press, New York.

Rose, A.H. (1976) — Chemical microbiology : an introduction to microbial physiology, 3rd ed. Butterworths, London.

Round, P.E. (1965) — The biology of algae. Edward Arnold, London.

Shelland, E.J. (1968) — Quantitative papepr and thin-layer chromatography. Academic Press, New York.

Smith, G. (1969) — An introduction to industrial micology, 6th ed. St. Martin's Press, New York.

Smith, J.E. and Berry, D.R. (1975) — Industrial mycology, Vol. 1. The filamentous fungi. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Smith, J.E., and Berry, D.R. (1976) — The filamentous fungi, Vol. 2. Edward Arnold, London.

Solomons, G.L. (1969) — Materials and method in fermen ation. Academic Press, New York.

Stahl, E. (1969) — Thin-layer chromatography, Springer, Berlin, New York.

Stanier, R.Y., Adelberg, E.A., and Ingraham, J. (1976) — The microbial world. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J.

Steel, R., and Miller, T.L. (1970) — Fermenter design. Adv. Appl. Microbiol., 12, 153—188.

Stewart, G.G. (1974) — Some thoughts on the microbiological aspects of brewing and other industries utilizing yeast. Adv. Appl. Microbiol., 17, 233—264.

Thoma, R.W. (1977) — Industrial microbiology. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, Pennsylvania..

Underkofler, L.A., and Hickey, R.J. (1954) — Industrial fermentation. Vol. 1 & 2. Chemical Publishing Co., Inc., New York.

Walter, W.G., and Mc Bee, R.H. (1962) — General microbiology, 2nd ed. Van Nostrand Co., Inc., New York.

Walter, H.F. (1976) — Ion-exchange chromatography. Dowden Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, Pennsylvania.

Weiser, H.H., Mountney, G.J., and Gold, W.A. (1971) — Practicol food microbiology and technology. 2nd ed. AVI Pub. Co., Inc., Westport, Conn.

Wilkinson, J.F., and Rose, A.H. (1963) — Fermentation processes. p. 395—397. In "Biochemistry of industrial microorganisms" (C. Rainbow and A.H. Rose, eds.). Academic Press, New York.

Zweig, G., and Whitaker, J.R. (1971) — Paper chromatography and electrophoresis, Vol. 2. Academic Press, New York.



PART 3 الباب الثالث

العمليات الايضية للاحياء المجهرية

MICROBIAL METABOLISM



الفصل الاول

الاسس العامة لمسارات نقل الطاقة والمسارات الايضية

General Principles of Energy Transfer Metabolic Pathways

---

1. مقـــدمة
2. تصنيف الخلايا تبعا لاحتياجاتها من مصادر الكربون والطاقة
3. العلاقة بين دورة الكربون وسريان الطاقة
4. دورة النتروجين والحاجة الى المركبات النتروجينية
5. مرونة واقتصاد الكائنات الحية في احتياجاتها الغذائية
6. الايض الهدمي والايض البنائي
7. العلاقة بين مسارات الايض الهدمي والبنائي والايض المزدوج
8. دورة الطاقة في الخلايا
9. السيطرة الخلوية على المسارات الايضية



1 . مقدمة

يمكن وضع تعريف عام للأيض metabolism بأنه نشاط متشعب الاوجه ومحدد الاهداف تشترك فيه عدة مجاميع من أنظمة متعددة الانزيمات multienzyme systems لتحقيق تبادل المادة والطاقة بين الخلية والبيئة المحيطة بها • وهناك أربع وظائف متخصصة للايض هي :ـ

1. استخلاص الطاقة الكيمياوية من البيئة المحيطة سواء من المواد الغذائية العضوية أو من ضوء الشمس •
2. تحويل المواد الغذائية الى وحدات بناء أساسية أو مركبات أولية مولدة Precursors للمركبات البيولوجية ذات الاوزان الجزيئية العالية التي تدخل في تركيب الخلايا •
3. ترتيب أو تحويل وحدات البناء الاساسية الى بروتينات واحماض نووية وليبيدات ومكونات أخرى ضرورية لحياة الخلية •
4. بناء وتكسير المركبات البيولوجية المطلوبة للقيام بوظائف خاصة في الخلايا •

وبصورة عامة تمتاز المسارات الايضية في الكائنات الحية المختلفة بتشابه تفاعلاتها وخاصة ما يعرف بالمسارات الايضية المركزية أو الاساسية بالرغم من وجود مئات من التفاعلات الانزيمية المختلفة في هذه المسارات •

ويتناول هذا الفصل مناقشة عامة واستعراضا لمصادر الطاقة والمادة الضروريتين الحية ، اذ أن التصنيف على أساس الصورة الكيمياوية للكربون الذي تحتاجه الخلا اضافة الى مسارات نقل الطاقة •

2. تصنيف الخلايا تبعا لاحتياجاتها من مصادر الكربون والطاقة

هناك أسس أو اعتبارات عديدة يمكن بموجبها تصنيف وتقسيم الخلايا الحية ، اذ أن التصنيف على أساس الصورة الكيمياوية للكربون الذي تحتاجه الخلايا من البيئة يقسمها الى مجموعتين رئيستين هما :

1. خلايا ذاتية التغذية Autotrophic Cells — وهي الخلايا التي بمقدورها استغلال ثاني أوكسيد الكربون كمصدر وحيد للكربون في بناء المركبات الحيوية المحتوية على الكربون •
2. خلايا غير ذاتية (متباينة) التغذية Hetetrophic Cells. — — وهي

الخلايا التي ليس بمقدورها استغلال ثاني أو اوكسيد الكربون ويتوجب عليها الحصول على الكربون من البيئة المحيطة بهـا بصورة معقـدة نسبيا ومختزلة كالجلوكوز •

وبالامكان اعتبار الخلايا ذاتية التغذية بانها تتميز بالاكتفاء الذاتي مقارنة بالخلايا غير ذاتية التغذية التي تحتاج الى مركبات ناتجة عن خلايا أخـرى وذلك بحكم احتياجها الى صيغة متطورة من الكربون • وتضم الخلايا ذاتية التغـذية الخلايا القادرة على القيام بعملية التخليق الضوئي وبعض انواع البكتريا ، فـي حين تشمل الخلايا غير ذاتية التغذية معظم الاحياء المجهرية وجميع خلايا الحيوانات لراقية •

كذلك يمكن تصنيف الخلايا تبعـا لمصادر الطاقـة التي تستغلها وذلك كما يلي :ـ

1. الخلايا الفوتوتروفية Phototrophs ـــ وهي الخـلايا التي تستعمل الضـوء كمصدر للطاقة •
2. الخلايا الكيموتروفية Chemotrophs ـــ وتستعمل هذه الخلايا الاكسدة والاختزال للحصول على الطاقة الا أنها تختلف فيما بينها في طبيعة مانحات الالكترونات Electron Donors التي تتم اكسدتها للحصول على الطاقة ، ويمكن تمييز نوعين رئيسين من الخلايا ضمن هذه المجموعة :ـ

1.2. Chemoorganotrophs ـــ وتتميز باحتياجها الى جزيئات عضوية معقدة تكون بمثابة مانحات الالكترونات مثل الجلوكوز • وتنقسم هذه الى قسمين :ـ

أ) الكائنات الحية الهوائية Aerobic ـــ وهذه الكائنـات تستعمل الاوكسجين الجزيئي كمستقبل نهـائي Ultimate acceptor للالكترونات الاتيـة من مانحات الالكترونات العضوية التي تستغلها هذه الكائنات كمصدر للكربون •

ب) الكائنات الحية اللاهوائية Anaerobic ـــ وهذه الكائنـات تستعمل جزيئـة أخرى كمستقبل للالكترونات عوضا عن الاوكسجين •

2.2. Chemolithotrophs ـــ وتتميز بكون مانحات الالكترونات التي تحتاجهـا عبارة عن جزيئات لا عضوية بسيطة مثل الهيدروجين وكبريتيد الهيدروجين والامونيا والكبريت • ويبين الجدول (1.1) خلاصة لتصنيف الكائنات الحية تبعا للاسس

السابق ذكرها مع بعض الامثلة المناسبة ◦ ويلاحظ من الجدول أن الغالبية العظمى من الكائنات الحية تقع ضمن النوعين الاول والرابع ، وأن الاحياء المجهرية المستخدمة في مجال التخمرات الصناعية تصنف ضمن النوع الرابع ◦

علاوة على ما ذكر ، فان هناك كائنات حية يمكنها العيش بصورة هوائية او لا هوائية أي اختيارية Facultative ، اذ تستطيع استعمال الاوكسجين أو او المركبات العضوية كمستقبل للالكترونات ◦ وتكون معظم الخلايا غير ذاتية التغذية (وخاصة خلايا الكائنات الراقية) اختيارية ولو أنها تحبذ استعمال الاوكسجين عند توفره ◦ كذلك ينبغي الانتباه الى أن المرونة الايضية العالية التي تتمتع بها بعض أنواع الاحياء التي تتجلى في احتوائها على أكثر من صنف أو نوع من الخلايا ◦ فالخلايا الخضراء المحتوية على الكلوروفيل والموجودة في أوراق النباتات الراقية تكون ذاتية التغذية قادرة على القيام بالتخليق الضوئي ، في حين تكون خلايا الجذور غير ذاتية التغذية ◦ وكذلك فان معظم خلايا الاوراق الخضراء تقوم بوظيفة التخليق الضوئي في ضوء الشمس أي ذاتية التغذية الا انها تتصرف كخلايا غير ذاتية التغذية في الظلام ◦

3. العلاقة بين دورة الكربون وسريان الطاقة

تمتاز الكائنات الحية في الطبيعة باعتمادها بعضها على البعض غذائيا ◦ فبعض الاحياء غير ذاتية التغذية تعتمد في عيشتها على أحياء لها القدرة على القيام بعملية التخليق الضوئي ، اذ تنتج الاخيرة مركبات عضوية كالجلوكوز من ثاني أوكسيد الكربون الجوي وتلفظ الاوكسجين ◦ في حين تقوم الاحياء غير ذاتية التغذية باستغلال الجلوكوز والاوكسجين الناتج وتعيد ثاني اوكسيد الكربون بلفظه الى الجو ثانية ◦ ويوضح الشكل (1.1) هذه العلاقة ◦

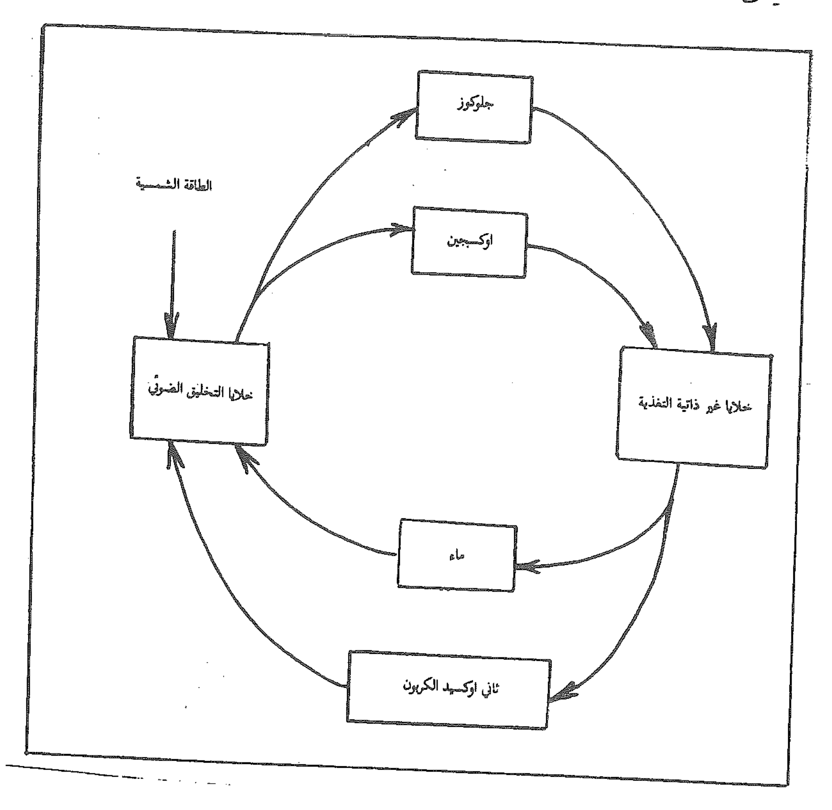
ويترافق سريان الطاقة وتحولها مع دورة الكربون ، اذ يجري تحويل الطاقة الشمسية الى طاقة كيمياوية مخزونة في جزيئات الجلوكوز اضافة الى نواتج الاختزال الضوئي الاخرى وذلك خلال التخليق الضوئي ◦ اذ تستفيد الكائنات الحية غير ذاتية التغذية من هذه الطاقة الكيمياوية للقيام بكافة التفاعلات والنشاطات المتطلبة للطاقة ◦ ويتضح من هذا ان الطاقة الشمسية هي المصدر

الجدول (1.1)

تصنيف الكائنات الحية تبعاً لمصدر الكربون ومصدر الطاقة

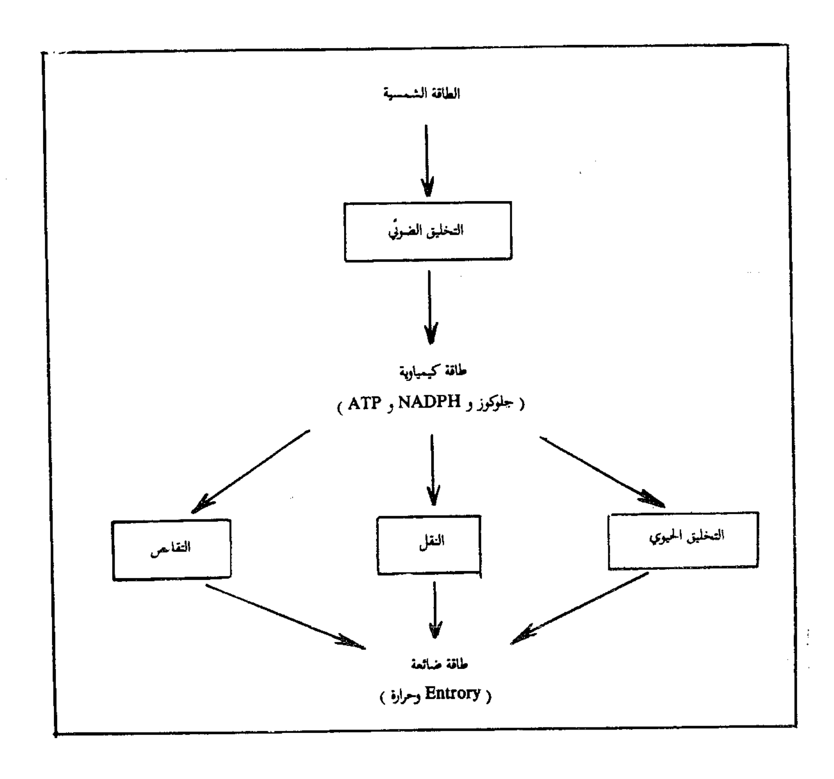
نوع الكائن الحي	مصدر الكربون	مصدر الطاقة	مانحات الالكترونات	الامثلة
Photolithotrophs .1	CO_2	الضوء	المركبات اللاعضوية (H_2O, H_2S, S)	الخلايا الخضراء في النباتات الراقية ، الطحالب الخضراء المزرقة ، بكتريا التخليق الضوئي .
Photoorganotrophs -2	المركبات العضوية اضافة الى CO_2	الضوء	المركبات العضوية	البكتريا الارجوانية غير الكبريتية Nonsulfur Purple bacteria
Chemolithorophs -3	CO_2	تفاعلات الاكسدة والاختزال	المركبات اللاعضوية (S, H_2, NH_3) (Fe^{+2}, H_2S)	بكتريا الحديد ، بكتريا الكبريت ، بكتريا الهيدروجين
Chemoorganotrophs-4	المركبات العضوية	تفاعلات الاكسدة والاختزال	المركبات العضوية (الجلوكوز)	معظم خلايا الاحياء المجهرية ، خلايا النباتات غير القادرة على القيام بالتخليق الضوئي ، جميع الحيوانات الراقية .

ويوضح الشكل (1.1) هذه العلاقة .



الشكل (1.1) الاعتماد الغذائي للكائنات الحية في الطبيعة

الاساس للطاقة لجميع أنواع الخلايا سواء كانت ذاتية التغذية أم غير ذاتية التغذية كما هو موضح في الشكل (2.1) • ان الاعتماد الغذائي للكائنات الحية المختلفة بعضها على البعض متمثلا بدورتي الكربون والطاقة يعـرف بالـ Syntrophy وهو بدوره يعد صفة مميزة لجميع الانظمة البيئية •



الشكل (2.1) سريان وتحويل الطاقة بين الانظمة البيولوجية

الجدول (2.1)

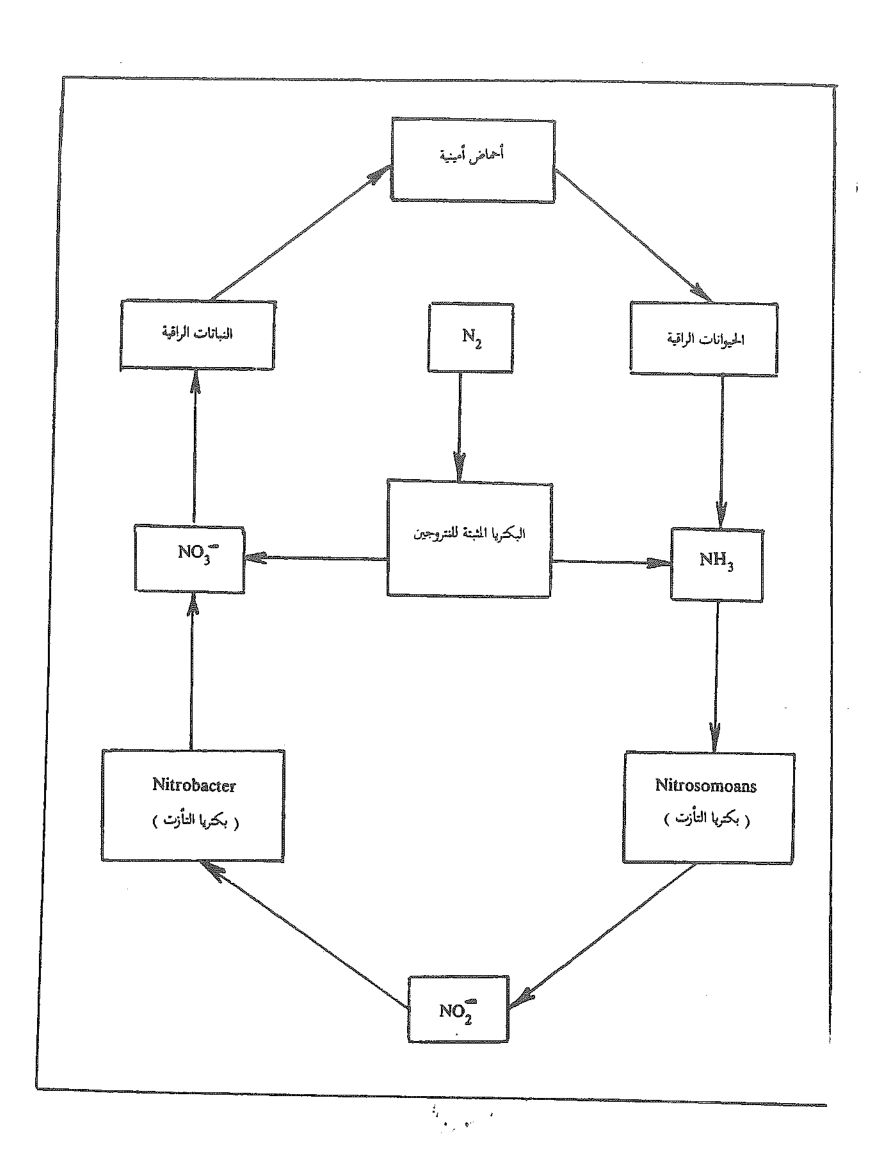
الاحتياجات الاساسية لنمو نوعين من البكتريا :

العنصر الغذائي	Escherichia coli	Leuconostoc mesenteroides
مصدر الكربون والطاقة	جلوكوز	جلوكوز
مصدر النتروجين	NH_4^+	NH_4^+
		الاحماض الأمينية : الانين ، ارجنين ، اسبارتيك ، اسباراجين ، سيستين ، جلوتاميك ، جلايسين ، هستدين ، ايسوليوسين ، ليوسين ، ميثيونين ، فنيل الانين ، برولين ، سيرين ، ثريونين ، تربتوفان ، تيروسين ، فالين .
		القواعد : ادنين ، جوانين ، يوراسيل ، زانثين .
		الفيتامينات : ثيامين ، بيريدوكسيد ، حامض البانتوثينيك ، رايبوفلافين ، حامض النيكوتينيك ، حامض أ ـ أمينو بنزويك ، بيوتين ، حامض الفوليك
العناصر المعدنية	Mg^{2+}, K^+, Na^+ SO_4^{2-}, HPO_4^{2-},	SO_4^{2-}, PO_4^{2-}, Mg^{2+}, K^+, Na^+ Mn^{2+}, Fe^{2+},

4. دورة النتروجين والحاجة الى المركبات النتروجينية

تحتاج الكائنات الحية الى النتروجين لتخليق البروتينات والاحماض النووية ، لذا فهو من العناصر التي تدور خلال الكائنات الحية في الطبيعة بواسطة الـ Syntrophy . ونظرا لكون النتروجين الجزيئي خاملا كيمياويا فان معظم الكائنات الحية لا تستطيع الاستفادة منه بالرغم من نسبته العالية في الغلاف الجوي ، الامر الذي يضطرها الى الحصول على النتروجين من البيئة بصورة متحدة كالنترات أو الامونيا أو مركبات أخرى أكثر تعقيدا مثل الاحماض الامينية . ومن ملاحظة دورة النتروجين المبينة في الشكل (3.1) يبدو واضحا ان الصيغة المتحدة للنتروجين في حالة دوران مستمر ، مما يجعل وجود النتروجين في المياه السطحية والتربة ضئيلا . حيث تحصل النباتات على معظم النتروجين الذي تحتاجه بصورة نترات من التربة ، وتقوم باختزالها وتحويلها الى أمونيا وأحماض أمينية ومركبات مختزلة أخرى تستغلها الحيوانات وتعيدها الى التربة بصورتها المختزلة . ويتم اعادة اكسدة الامونيا وتحويلها الى نترات ونتريت بفعل احياء التربة المجهرية حيث تستفيد منها النباتات مرة أخرى وهكذا . في حين يتم تجهيز النتروجين المتحد من اختزال النتروجين الجوي بواسطة البكتريا المثبتة للنتروجين .

ويعتمد العديد من الكائنات الحية غذائيا على صيغ كيمياوية متخصصة جدا من النتروجين المتحد الاتي من البيئة . ويوضح الجدول (2.1) مدى التباين في درجة الاعتماد هذه . ففي حين يمكن لبكتريا E. Coli استغلال مركب بسيط كالامونيا كمصدر وحيد للنتروجين لتخليق جميع الاحماض الامينية والمركبات النتروجينية الاخرى ، فان بكتريا Leuconostoc mesenteroides لا يمكنها العيش على الامونيا وحدها بل تحتاج الى 32 عنصرا غذائيا نتروجينيا مختلفا بضمنها معظم الاحماض الامينية . والحاجة التي تبديها بعض الكائنات الحية الى الفيتامينات تنبع من عدم قدرتها على تخليق هذه المركبات العضوية الضرورية التي تدخل في تركيب المرافقات الانزيمية Coenzymes . وعادة فان مثل هذه الكائنات الحية تحتاج الى كميات ضئيلة من الفيتامينات مقارنة بالعناصر الغذائية الاخرى (كالجلوكوز على سبيل المثال) وذلك لكون المرافقات



الشكل (3.1) دورة النتروجين في الكائنات الحية

الانزيمية موجودة في الخلايا بتراكيز واطئة جدا • وعلى سبيل المثال تحتاج بعض أنواع البكتريا الى البيوتين بحدود 10^{-12} ملغم لكل مل من وسط النمو •

5. مرونة واقتصاد الكائنات الحية في احتياجاتها الغذائية

تمتاز الكائنات الحية بامتلاكها مرونة أيضية كبيرة تتمكن بواسطتها من التأقلم مع الظروف الغذائية من ناحية النوع والكم المتاحين في البيئة وذلك ضمن حدود التصنيف الايضي الاساس للكائن الحي • اذ بالرغم من كون بكتريا **E. Coli** تصنف ضمن مجموعة الاحياء Chemoorganotrophs الا أنها تبدي تباينا يضيا كبيرا في احتياجاتها وتأقلمها ، فهي تستطيع استعمال الجلوكوز اضافة الى سكريات أخرى ، والجليسرول ، والاحماض الامينية ، والكحول الاثيلي ، أو الخلات كمصدر وحيد للكربون • ان هذه المرونة ناتجة عن امكانية تحويل جميع هذه المركبات الوسطية في خلية **E. Coli** الى مركبات قابلة للدخول في المسارات الايضية المركزية • الا أن هذه البكتريا تتمكن من استغلال مركبات أخرى ، فضلا عن الامونيا ، كمصادر نتروجينية مثل الاحماض الامينية وقواعد لبيورين وقواعد البيريميدين والكولين وغيرها من المركبات النتروجينية • والملاحظ أن خلايا **E. Coli** تنمو بسرعة ملحوظة عند استبدال الامونيا بخليط متكامل من الاحماض الامينية وقواعد البيورين والبيريميدين الضرورية لتخليق البروتينات والاحماض النووية • وترجع الزيادة في سرعة النمو الى أن وجود هذه المركبات في وسط النمو يوفر على الخلية مهمة تخليقها من الامونيا عند وجود الاخيرة كمصدر وحيد للنتروجين •

ان توفر الاحماض الامينية (في وسط النمو) يجعل الخلايا تتوقف عن استعمال الامونيا ، اذ تعد هذه الاحماض بمثابة اشارة ايقاف للجينات المسؤولة عن تخليق الانزيمات المطلوبة لتحفيز تفاعلات تخليق الاحماض الامينية من الامونيا ، أي توفير الشغل الايضي والطاقة المصروفة في تخليق تلك الانزيمات التي أصبحت عديمة الفائدة • ويصطلح على تسمية عملية ايقاف الجينات هذه بالكبح أو القمع Repression • أما عند توفر الاحماض الامينية في بيئة النمو بتراكيز دون الحد الادنى فان الكبح الواقع على هذه الجينات يزول ويتم

وسوف ترد مناقشه أكثر تفصيلا عن الاساليب التي تتبعها الخلية في الاحتفاظ بالطاقة والمادة في مكان اخر من هذا الفصل ٠

6. الايض الهدمي والايض البنائي

ان الايض الهدمي Catabolism والايض البنائي Anabolism يشكلان الجزئين اللذين يتألف منهما الايض Metabolism ٠ فالايض الهدمي هو عملية تكسير لجزيئات المكونات الغذائية الكبيرة (كربوهيدرات وليبيدات وبروتينات) بفعل الانزيمات وبتفاعلات تكون معظمها تأكسدية oxidative الى مجموعة من الجزيئات الصغيرة أبسط تركيبا مثل حامض اللاكتيك أو حامض الخليك أو ثاني أوكسيد الكربون أو الامونيا أو اليوريا ٠ وتحصل الخلية على المكونات الغذائية المذكورة أما من البيئة المحيطة أو من أجزائها التي تقوم بخزن هذه الجزيئات ٠ ويصاحب الايض الهدمي تحرر مقدار من الطاقة الحرة التي كانت مخزونة في التركيب المعقد للمكونات الغذائية الكبيرة حيث أنها تتحرر بفعل تكسير واكسدة هذه الجزيئات ومن ثم تخزن بصورة روابط فوسفاتية غنية بالطاقة في مركبات معينة مثل ثلاثي فوسفات الادينوسين (ATP) ٠

أما الايض البنائي فيشمل مجموعة تفاعلات تخليق انزيمية للجزيئات الكبيرة التي تدخل في تكوين الخلية (كالسكريات المتعددة والبروتينات والليبيدات والاحماض النووية) وذلك من جزيئات المواد الاولية المولدة Precursors ٠ وتتطلب تفاعلات الايض البنائي مقدارا من الطاقة الحرة وذلك لانخفاض الانتروبي Entropy الذي يرافقها والناجم عن زيادة تعقيد تركيب وحجم الجزيئات الناتجة عن تفاعلات التخليق ٠ ويكون امداد الطاقة الحرة المطلوبة لهذه التفاعلات بصورة ATP , حيث أن تفاعلات الايض البنائي والهدمي تجري بصورة مترافقة في الخلية ٠ وبصورة أعم يتألف الايض بجزئيه الهدمي والبنائي من نوعين من العمليات يسيران بصورة متلازمة (في آن واحد) ويعتمد احدهما على الاخر ٠ يشمل النوع الاول سلاسل التفاعلات الانزيمية التي يتم فيها تخليق أو تكسير جزيئات أحد المركبات الحيوية . وتسمى المركبات الوسطية في هذا النوع من التفاعلات بالمركبات الايضية Metabolites وهذا الجزء من التفاعلات الايضية يسمى

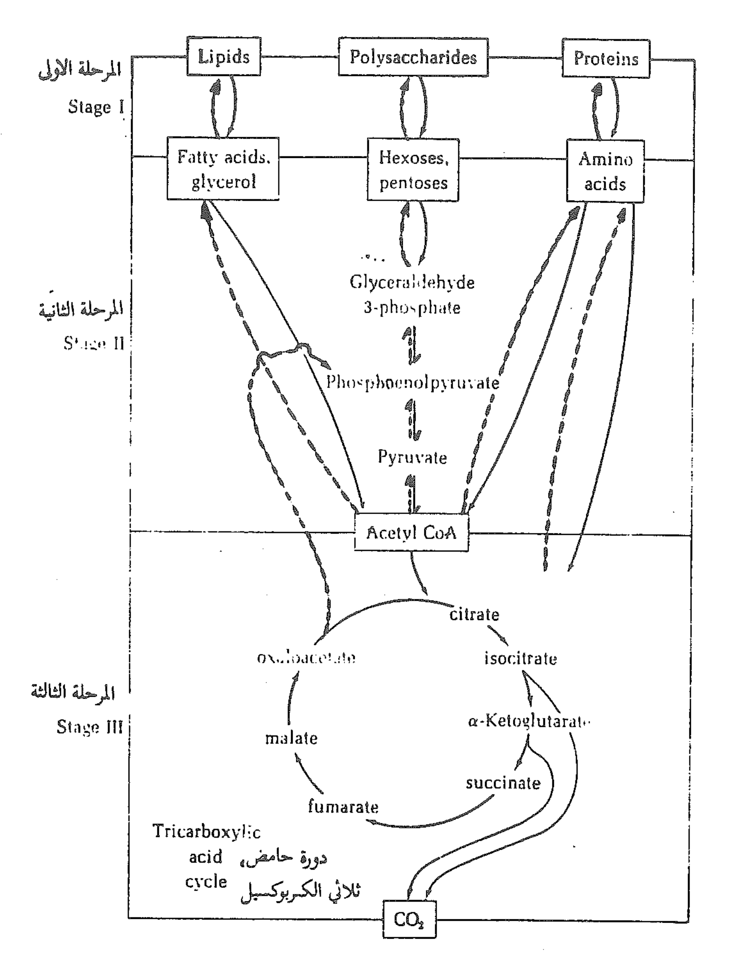
بالايض الوسطي Intermediary Metabolism . أما النوع الثاني فهو تغيــر الطاقة المصاحب لتفاعلات الايض الوسطي حيث يعتمد مقــدار التغيــر على نــوع التفاعل * ويتم حفظ جزء من الطاقة المتحررة من بعض التفاعلات عند خطوات ومراحل من الايض الهدمي بشكل روابط فوسفاتية غنية بالطاقة تستغل عند مراحل معينة من الايض البنائي عندما تدعو الحاجة الى طاقة لتسيير التفاعلات ، وهــذا ما يعرف بازدواج الطاقة Energy Coupling , لــذا يتوجب مراعــاة العاملين الاتيين عند دراسة المسارات الايضية :

1. معرفــة التفاعلات التي يحــدث فيها تغيــر الروابط التساهمية أو التركيب التساهمي للمركب الاولي لتكوين الناتج ٠
2. تغييرات وتبادلات الطاقة الكيمياوية المصاحبة لهذا التحويل ٠

7. العلاقة بين مسارات الايض الهدمي والايض البنائي والايض المزدوج

كما مر سابقا ، فان تكسير المكونات الغذائية ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة (كربوهيدرات وليبيدات وبروتينات) يتم عبر سلسلة من التفاعلات الانزيميــة المتعاقبة ٠ ويتم الايض الهدمي لهذه المكونات الغذائية في المراحل الاساسية الثلاث التالية وكما هو موضح في الشكل (4.1) ٠

1. **المرحلة الاولى :ـ** ويجري فيها تكســير جزيئات المواد الغــذائية الكبيرة الى وحدات تركيبية اساسية ٠ فالسكريات المتعددة تتكسر لتعطي السكريات الخماســية أو السداسية الداخلة في تركيبها ، وينتج عن تكسير البروتينات الاحماض الامينية العشرون التي تدخل في تركيبها ، فيما ينتج عن تكسير الليبيدات الاحماض الدهنية والجليسرول وبعض الوحدات التركيبية الاخرى ٠
2. **المرحلة الثانية :ـ** ويتم في هــذه المرحلة جمع نواتــج عمليــات وتفاعلات المرحلة الاولى وتحويلها الى مركبات أبســط ٠ فالسكريات الخماســية والسداســية والجليسرول تتحول الى سكر ثلاثي مفسفر هو جليسرألدهيد-3 -فوسفات أولا ، ومن ثم الى صيغة ثنائية الكربون وهي مجموعة الاستيل في مركب أستيل-كوأ ، وهي الصيغة التي تكون عليها نواتج تكسير الاحماض الدهنية ٠ أمــا الاحماض الامينية العشرون الناتجة عن تكسير البروتينات فانها تتحول الى عدد من المركبات



الشكل (4.1) • مراحل الايض الهدمي والايض البنائي

(تمثل الاسهم غير المتقطعة مسارات الايض الهدمي

والاسهم المتقطعة مسارات الايض البنائي)

هي أستيل-كوا ، و∝- كيتوجلوتارات ، وسكسينات ، وفيومارات ، واوكزالوأستيات .

3. المرحلة الثالثة :- وتعد هذه المرحلة بمثابة المرحلة النهائية المشتركة لجميع نواتج المرحلتين الاولى والثانية ، حيث تتم اكسدتها لتعطي ثاني أوكسيد الكربون والماء .

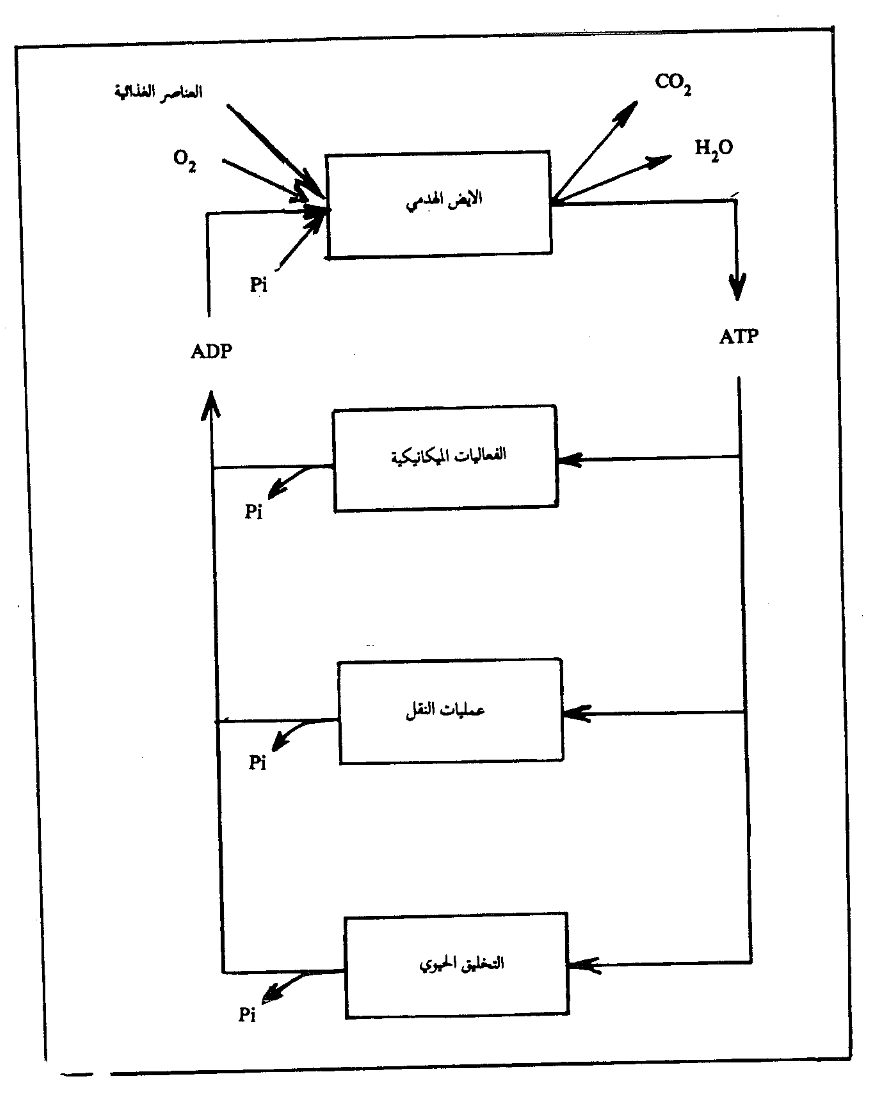
أما الايض البنائي ، فانه أيضا يتم في ثلاث مراحل مبتدئا بوحدات البناء التركيبية الصغيرة الناتجة من المرحلة الثالثة من الايض الهدمي أو المتواجدة فيها . فالاحماض من نوع الفا-كيتو ∝-Keto acids تعد مصادر أولية لتخليق الاحماض الامينية (من نوع الفا) وهي بدورها تشكل الوحدات التركيبية الاساسية في تخليق البروتينات . أي أن المرحلة الثالثة من الايض الهدمي تكون مشتركة بينه وبين الايض البنائي بالرغم من اختلاف طبيعة تفاعلاتهما . ونظرا لكونها طريقا مشتركا فانها تدعى أحيانا بمسار الايض المزدوج Amphibolic Pathway . اذ يمكن ان تستغل مسارات هذه المرحلة من قبل الخلية في الايض الهدمي وذلك بتكسير واكسدة نواتج المرحلة الثانية ، أو تستغل في الايض البنائي وذلك بامداد المرحلة الثانية منه بجزيئات المركبات الاولية المولدة الضرورية لهذه المرحلة . أما ترابط تفاعلات الايض فانه ناجم عن كون ناتج التفاعل لانزيم معين هو مادة تفاعل للانزيم الذي يليه في سلسلة التفاعلات الانزيمية . وأخيرا فان معظم تفاعلات الايض الوسطي تتضمن تفاعلات متعاقبة يتم خلالها انتقال مجاميع أمينو ، فوسفات ، مثيل ، فورميل ، أو كربوكسيل أو ذرات هيدروجين بين المركبات الايضية المختلفة .

8. دورة الطاقة في الخلايا

من الحقائق الثابتة ، امتلاك الجزيئات العضوية المعقدة على مقدار كبير نسبيا من الطاقة الكامنة نتيجة لارتفاع رتبة أو درجة النظام التركيبية Structural Order والذي يعني بكلمة اخرى امتلاكها لدرجة واطئة من العشوائية أي ذات انتروبي Entropy واطيء . وعلى سبيل المثال عند أكسدة جزيئة جلوكوز بواسطة الاوكسجين الجزيئي لتعطي ستة جزيئات من CO_2 وستة

جزيئات هام ، فان درجة عشوائية الذرات تزداد وذلك لانفصالها بعضها عن بعض مما يكسبها القدرة على احتلال مواقع مختلفة بالنسبة لعلاقتها ببعضها • اذن بسبب هذه الاكسدة فان جزيئة الجلوكوز تفقد مقدارا من الطاقة الحرة ، والتي هي طاقة قابلة للاستغلال في انجاز شغل تحت درجة حرارة وضغط ثابتين • وانطلاقا من هذا الاساس تقوم الخلية بحجز واستغلال الطاقة المتحررة من الجلوكوز لانجاز شغل ، اذ أن تفاعلات الاكسدة البيولوجية ما هي الا عمليات احتراق تجري على درجة حرارة واطئة • ولكون الكائنات الحية تعيش على درجة حرارة ثابتة نسبيا فانه من غير الممكن الاستفادة من الحرارة كمصدر للطاقة لا سيما أن انجاز شغل بواسطة الحرارة تحت ضغط ثابت يتطلب سريانها من جسم ساخن الى جسم بارد • ويتم حفظ الطاقة الحرة بصورة طاقة كيمياوية ، حيث تحقق الخلية هذا الحفظ باستغلال تفاعلات الاكسدة والاختزال التي تحدث في مسارات الايض الهدمي وذلك بأسلوبين هما :ـ

1. حفظ الطاقة الحرة بصورة رابطة الفوسفات الغنية بالطاقة في ثلاثي فوسفات الادينوسين (ATP) حيث يخلق هذا المركب من ثنائي فوسفات الادنيوسين (ADP) والفوسفات اللاعضوية ، وذلك بواسطة نقل مجموعة الفوسفات انزيميا في تفاعلات تسير بصورة مزدوجة coupled مع خطوات وتفاعلات اكسدة في مسارات الأيض الهدمي • وبفعل امكانية ATP كمركب على الانتشار والوصول الى اجزاء الخلية التي تحتاج الى الطاقة ، فانه يعد أيضا صيغة أو أسلوبا لنقل الطاقة • وتتم الاستفادة من الطاقة الكيمياوية لهذا المركب الغني بالطاقة من خلال انتقال مجموعة أو مجموعات الفوسفات الطرفية الى جزيئة أخرى بحيث تصبح الاخيرة ذات طاقة كافية لانجاز شغل • ويوضح الشكل (5.1) الخطوط العامة لتحولات الطاقة وتغيراتها لكل من ATP و ADP •



الشكل (5.أ) : دورة ATP و ADP في الخليه
(الفوسفات اللاعضوية = Pi)

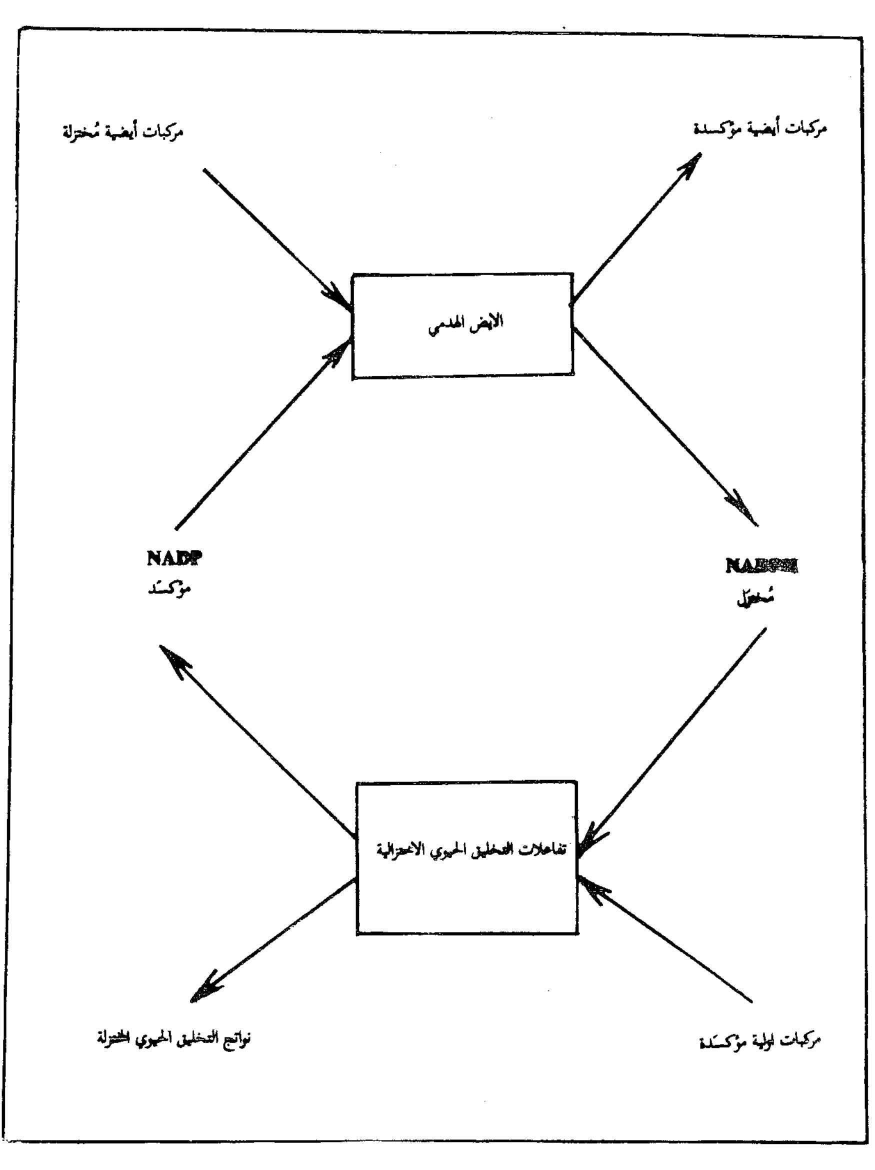
2. نقل الطاقة الناتجة من تفاعلات الاكسدة والاختزال في الايض الهدمي الى تفاعلات الأيض البنائي أو التخليق الحيوي التي تحتاج اليها بصورة أو هيئة الكترونات ، كما في تخليق المركبات الحيوية ذات المحتوى العالي من الهيدروجين وخاصة الاحماض الدهنية والكوليستيرول • اذ يتم نقل الالكترونات في الخلية بواسطة الانزيمات وذلك من تفاعلات الاكسدة المنتجة للالكترونات في الايض الهدمي الى المجاميع والمركبات التي تحتاج الى الالكترونات • وتشترك في تفاعلات نقل الالكترونات هذه المرافقات الانزيمية الناقلة للالكترونات وفي مقدمتها NADP (نيكوتين أميد ادينين ثنائي نيوكليوتيد فوسفات) الذي يقوم بنقل الالكترونات الغنية بالطاقة الاتية من تفاعلات الايض الهدمي الى تفاعلات الايض البنائي التي تحتاج الى هذه الالكترونات وكما هو موضح في الشكل (6.1) •

9. السيطرة الخلوية على المسارات الايضية

قبل استعراض الاساليب الرئيسة لسيطرة الخلية على المسارات الايضية ، ينبغي تأكيد أن المبدأ الذي تسير بموجبه جميع هذه المسارات ينطوي على درجة كبيرة من الاقتصاد في الطاقة • اذ أن سرعة الايض الهدمي في الخلية تتحدد باحتياجاتها الانية من الطاقة (بصورة ATP) وليس بتركيز العناصر الغذائية في البيئة المحيطة بها • كذلك بالمقابل فان سرعة التخليق الحيوي (الايض البنائي) تتحدد بالحاجة الانية لمكونات الخلية ، اذ ان سرعة تخليق الاحماض الامينية مثلا تكون متناسبة مع تزويد الخلية بالمقدار الادنى والضروري من وحدات البناء الاساسية التي تدخل في تخليق البروتينات •

ويتم تنظيم المسارات الايضية في الخلية بعدة أساليب وعلى عدة مستويات يمكن تصنيفها ضمن الانواع العامة التالية :ــ

1. يشمل النوع الاول ، الذي يعد من أبسط الانواع ، بعض العوامل والمتغيرات الاساسية المؤثرة في سرعة التفاعلات الانزيمية مثل الاس الهيدروجيني (pH) ، وثابت ميكيليس Michaelis Constant ، والميل Affinity اتجاه المرافقات الانزيمية وايونات الفلزات المنشطة والتي تعد صفات مميزة لكل



الشكل (6.1) : دور NADP في نقل القوة الاختزالية (الالكترونات) في الخليـة

انزيم موجود ضمن نظام متعدد الانزيمات . وهذا يعني ان السرعة الكليـة لمثل هذا النظام في الخلية تعتمد على تركيز كل من الانزيمات الداخلـة فيه ، والاس الهيدروجيني (pH) ، وتراكيز المركبات الوسطية ، وتراكيز الايونات الفلـزية ، والمرافقات الانزيميـة في الخليـة . اذ يعتمـد الاس الهيدروجيني الخلـوي على السرعة النسـبة لجميـع التفاعـلات المحـررة والمستهلكة للبروتونات ، وينجم عن ذلك تأثر المسار الايضي بأية عملية أو خطوة تؤثر في الاس الهيدروجيني للخلية . كذلك الحال بالنسبة للمركبات الايضية الوسطية اذ أن تركيز الحالة الثابتة **Steady State** لمركب أيضي وسطي معين يعتمد على سرعتي تكوينه واستغلاله اللتين يحددهما نشـاط مجموعة الانزيمات الداخلة في النظام اضافة الى سرعة التفاعلات الانزيمية التي بامكانها تكوين واستهلاك هذا المركب الايضي الوسطي . وأخيرا فـان التراكيـز المتيسرة من المرافقات الانزيمية الضرورية والايـونات الفلـزية الاساسية تحددها اعتبارات مماثلة لا سيما انها تكون موضع تنافس العديد من الانزيمات .

2. أما النوع الثـاني من التنظيم والسـيطرة فـانه يتـم بواسـطة الانزيمات المنظمة **Regulatory Enzymes** التي تكون عادة عند بداية تفاعلات المسار الايضي المتعدد الانزيمات أو قربها . وتكون أغلب الانزيمات المنظمة حساسة للتثبيط بواسطة الناتج النهائي من تفاعلات المسار ويدعى هذا النوع من التثبيط بتثبيط الناتج النهائي **End-Product Inhibition** أو تثبيط التغذيـة الرجعية **Feed-Back Inhibition** أو قـد يسمى بالتثبيط الارتجاعي **Retroinhibition** . . وعلى سبيل المثال يكون ATP بمثابـة مثبط آللوستيري **Allosteric Inhibitor** في الانظمة الانزيمية التي يتم بواسطتها تخليقه من ADP وذلك بصورة مزدوجة مع تفاعلات الايض الهدمي . كذلك الحال في المسارات التي يجري فيها تخليق المركبات الحيوية فان المركب الناتج هو الذي يتصرف كمثبط آللوستيري . والملاحظ ان بعض الانزيمات الاللوستيرية تسـتجيب لتنشيط أو تثبيط اثنين أو أكثـر من المنشطـات أو المثبطـات التي قـد تكـون ناتجـة عن أثنين أو أكثـر

من سلاســل التفاعــلات الايضــية المختلفــة • لــذا فــان مثــل هـــذه الانزيمات تســمى Multivalent Allosteric Enzymes وبامكانهــا تنظيم سرعة مسارين أو اكثر من المسارات الايضية •

3. تعد السيطرة الوراثية على سرعة تخليق الانزيم أحد الاساليب التي تتبعها الخلية في التنظيم الايضي ، وذلك لاعتماد سرعة المسار الايضي على تركيز الصورة الفعالة لكل من الانزيمات الداخلة فيه • وتعتمد التراكيز الفعالة لهذه الانزيمات على مقدار الاتزان بين تخليقها وتكسيرها • ومن الممكــن تمييز نوعين أساسيين من الانزيمات :ــ

أ) الانزيمات التكوينية Constitutive Enzymes -- وهذه الانزيمات تكون موجودة دائما في الخلية وبتراكيز ثابتة تقريبا •

ب) الانزيمات المستحثة أو التطبعية Induced or Adaptive Enzymes — وهذه الانزيمات لا تكون موجودة دائما في الخلية بل يتم تخليقها استجابة الى وجود مواد تفاعل معينة ، حيث تكون الجينات المسيطرة على تخليــق هــذه الانزيمات في حالــة كبــح Repression وعنــد وجــود عــامل مستحث Inducing Agent يتم تنشيطها أو ازالة الكبح Derepression استجابة لهذا العامل •

الفصل الثاني

توليد ونقل الطاقة الحيوية

Generation and Transfer of Biological Energy

1. مقـــدمة
2. مفهوم الطاقة الحرة
3. المركبات الغنية بالطاقة
4. مسارات انتقال مجاميع الفوسفات
5. دور مركبات الفوسفات الغنية بالطاقة في مسارات التخليق الحيوي

1 . مقدمة

بعد استعراض الاسس والمباديء العامة التي تحكم المسارات الايضية ومسارات نقل الطاقة في الخلايا ، ينبغي مناقشة مسارات توليد ونقل الطاقة الحيوية بشيء من التفصيل ، اذ أنها تشكل ركنا مهما في حياة الخلية لا غنى لها عنه ·

ان معرفة تفاصيل مسارات الايض الوسطي Intermediary Metabolism تتطلب استيعاب وفهم أساليب الخلية في استغلال الطاقة الكيمياوية الموجودة في البيئة المحيطة لتسيير فعالياتها الحيوية · وفي هذا المجال نؤكد مفهوم دورة الطاقة الذي يتضمن تكسير جزيئات مختلفة تحتوي على طاقة كيمياوية كامنة (بمثابة جزيئات وقود) بواسطة تفاعلات انزيمية لانتاج مركبات غنية بالطاقة · ومن أهم المركبات الغنية بالطاقة والتي تؤدي دورا أساسيا في دورة الطاقة ثلاثي فوسفات الادينوسين (ATP)وثنائي فوسفات الادينوسين (ADP) ، اذ أن كلا منهما قابل للتحول الى الاخر · ويعمل ثلاثي فوسفات الادينوسين (ATP) كمصدر رئيس للطاقة اللازمة لتسيير العديد من تفاعلات التخليق الحيوي اضافة الى بعض الفعاليات الحيوية كالحركة والافراز والامتصاص · ولغرض فهم تغيرات الطاقة لنظام ATP-ADP وغيرهما من المركبات الغنية بالطاقة فان من الضروري تعريف وتوضيح بعض المصطلحات الاساسية في مجال الديناميكا الحرارية Thermodynamics ومن ثم تصنيف المركبات الغنية بالطاقة ومعرفة دورها في المسارات الايضية ·

2- مفهوم الطاقة الحرة

تعد الطاقة الحرة من أكثر مفاهيم الديناميكا الحرارية أهمية في مجال توليد ونقل الطاقة الحيوية ، اذ أن لكل مادة محتوى معينا من الطاقة الحر (G) الا أنه ليس بالامكان قياس هذا المحتوى للمادة (A) مثلا مختبريا · ولكن من الممكن قياس التغير في الطاقة الحرة (ΔG) عند تحول A الى B في تفاعل كيمياوي :

$$A \rightleftharpoons B$$

اذ يمكن في ضوء هذا التفاعل تعريف التغير في الطاقة الحرة ΔG بأنه أكبر مقدار من الطاقة يصبح متاحا عند تحول A الى B . ويمكن حساب ΔG لهذا التفاعل كالاتي :ـ

$\Delta G = G_B - G_A$

فاذا كان محتوى الطاقة الحرة للناتج B (G_B) أوطأ من محتوى الطاقة الحرة للمادة المتفاعلة A (G_A) فان ΔG للتفاعل يكون كمية سالبة ، أي يساحب حدوث هذا التفاعل انخفاض في الطاقة الحرة ٠ وبالمقابل فان التفاعل الذي يحدث فيه اعادة تحول B الى A يكون مصحوبا بزيادة في الطاقة الحرة مما يجعل ΔG كمية موجبة ٠ وبصورة عامة تكون التفاعلات التي تحدث تلقائيا Spontaneously مصحوبة بانخفاض في الطاقة الحرة أي (ΔG -) ٠ وعلى العكس من ذلك فان التفاعلات التي يكون فيها ΔG كمية موجبة لا تحدث دون امدادها بمقدار من الطاقة الضرورية لتسييرها ٠ ويصطلح على تسمية التفاعلات التي لها ΔG سالبة باسم Exergonic Reaction وتلك التي لها ΔG موجبة باسم Endergonic Reaction ٠

ومن الضروري التنويه الى عدم وجود أية علاقة بين كون ΔG كمية سالبة لتفاعل ما وبين السرعة التي يسير بها ذلك التفاعل ٠ ولتوضيح ذلك لنلاحظ تفاعل اكسدة سكر الجلوكوز بواسطة الاوكسجين الى ثاني أوكسيد الكربون والماء :

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O \quad \Delta G = -\,686{,}000 \text{ Cal/mole}$$

ان تفاعل الاكسدة هذا يجري في ثوان معدودة عند توفر العامل المساعد المناسب في المسعر القنبلي Bomb Calorimeter كما أنه يتم في الخلايا الحية بسرع متفاوتة تتراوح بين عدة دقائق الى عدة ساعات ٠ بيد أن الجلوكوز يبقى ثابتا دون أكسدة ولسنوات عند وضعه في قنينة وبوجود الهواء ٠ لذا فان كون تغير الطاقة الحرة لتفاعل ما كمية سالبة يعد دلالة على تلقائية حدوث التفاعل عند توفر الظروف المناسبة والعوامل المساعدة (كالانزيمات) وليس على السرعة التي يسير بها ذلك التفاعل ٠ ويرتبط تغير الطاقة الحرة للتفاعل بمتغيرات الديناميكا الحرارية الاخرى للمادتين A و B بواسطة العلاقة التالية :-

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

حيث أن :

التغير في المحتوى الحراري الذي يطرأ = ΔH = **Change** in Enthalpy
عند حدوث التفاعل تحت ضغط ثابت ·

التغير الذي يطرأ على درجة العشوائية = ΔS = Change in Entropy
في نظام ما ·

درجة الحرارة المطلقة = **T**

يلاحظ من المعادلة ان زيادة مقدار الانتروبي **Entropy** للنواتج مقارنة بالمواد المتفاعلة يجعل قيمة الحد $T \Delta S$ موجبة اكثر وبالتالي يؤدي الى جعل **قيمة** ΔG سالبة أكثر · وكذلك ترتبط **قيمة** ΔG بتراكيز النواتج والمواد المتفاعلة اذ تستغل هذه العلاقة في حساب وتقدير ΔG كما هو موضح فيما يلي بالنسبة لتفاعل تحول المادة **A** الى المادة **B** :—

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[A]}{[B]}$$

حيث أن :

تغير الطاقة الحرة القياسي = ΔG° = Standard Change in free **energy**

ويعرف بأنه تغير الطاقة الحرة عندما تكون النواتج والمواد المتفاعلة موجودة في حالاتها لقياسية Standard State ، أي مذابة بتراكيز مساوية الى 1 M ، أو ضغط جوي واحد للغازات ، أو وحدة فعالية واحدة Unit Activity بالنسبة للمذيبات المشتركة في التفاعل (كالماء) ·

الثابت الغازي = R = 1.987 **cal/mole-deg**

درجة الحرارة المطلقة = T

تركيز الناتج معبرا عنه بوحدات مول/لتر = [B]

تركيز المادة المتفاعلة معبرا عنه بوحدات مول/لتر = [A]

ولغرض حساب **قيمة** ΔG° يؤخذ بنظر الاعتبار الحالة عند الاتزان أي عندما لايكون **هناك تحول صاف** Net Conversion من A الى B وتكون **قيمة** ΔG عندما مساوية الى الصفر · كذلك تكون النسبة بين $\frac{[B]}{[A]}$ مساوية الى النسبة عند الاتزان أي مساوية الى ثابت اتزان التفاعل (Keq) · وفيما يلي توضيح لهذه العلاقات :ـــ

ويرمز لتغير الطاقة الحرة القياسي عند أي اس هيدروجيني عدا pH صفر ($[H^+]=1M$) بالرمز $\Delta G'$ بدلا من ΔG° أما عند عدم استهلاك وتكوين البروتونات في تفاعل ما ، فان ΔG° سوف تكون مساوية الى $\Delta G'$ ◦

3. المركبات الغنية بالطاقة

تتميز المركبات الغنية بالطاقة Energy-Rich Compounds أو كما تعرف أيضا بمركبات الطاقة العالية بكون تفاعلات تحللها المائي مصحوبة بانخفاض كبير في الطاقة الحرة ، وكذلك بكونها قلقة في الوسط الحامضي والقلوي ، وأيضا تجاه الحرارة ◦

ان من أهم المركبات التابعة لهذه المجموعة هو ثلاثي فوسفات الادينوسين ATP الذي ينتشر في جميع أنواع الخلايا الحية ، اذ يعمل هذا المركب وبصورة مستمرة كمادة تفاعل مشتركة رابطا بين التفاعلات من نوع Endergonic والتفاعلات من نوع Exergonic ◦ ◦ ان ثنائي ATP-ADP أو كما يسمى نظام ATP-ADP يلعب دورا أساسيا في تفاعلات وعمليات نقل الطاقة ◦ ونظرا لاهمية هذه المجموعة من المركبات في المسارات والتفاعلات الايضية المختلفة ولغرض فهم الدور الذي تقوم به لا بد من الوقوف على طبيعة تركيبها الكيمياوي وذلك من خلال تقسيمها بالشكل الاتي :ـ

1.3. مركبات البيروفوسفات Pyrophosphate Compounds

وهذه المركبات هي من نوع نيوكليوسيد -5- ثلاثي الفوسفات وتقع ضمنها مركبات ATP و UTP و CTP و GTP ◦ الا أن أكثرها أهمية هو ATP المبين في الشكل (1.2) وذلك لكونه الناقل الرئيس لمجاميع الفوسفات في عمليات نقل الطاقة بالخلية ◦ ويبلغ مجموع تراكيز ATP و ADP و AMP في الخلية مقدارا يتراوح بين (2 — 15 mM) اذ يكون تركيز ATP أعلى بكثير من مجموع تركيز المركبين الاخرين ◦

Adenosine triphosphate (ATP) ادينوسين ثلاثي الفوسفات

Adenosine diphosphate (ADP) ادينوسين ثنائي الفوسفات

الشكل (1.2) : الصيغ التركيبية لكل من ATP و ADP

وتتحلل مجموعة الفوسفات الطرفية في ATP تحللا مائيا يسمى تكسر الاورثوفوسفات **Orthophosphate Cleavage** وكما هو موضح في المعادلة التالية ، اذ يكون مصحوبا بانخفاض في الطاقة الحرة وينتج عنه ADP وفوسفات لا عضوية .

$$\text{Adenine-Ribose-O-}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{-O-}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{-O-}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{-O}^- + H_2O \longrightarrow$$

ATP

$$\text{Adenine-Ribose-O-}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{-O-}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{-O}^- + \text{HO-}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{-O}^- + H^+$$

ADP

$\Delta G' = -7300$ cal (pH 7.0)

وبالرغم من حدوث هذا التحلل في العديد من مسارات وتفاعلات الايض الوسطي فان هناك عددا من التفاعلات المهمة التي يتم خلالها كسر رابطة البيروفوسفات الداخلية لل ATP لاعطاء احادي فوسفات الادينوسين AMP وبيروفوسفات لا عضوية . ويعرف هذا النوع من التحلل باسم تكسر البيروفوسفات Pyrophosphate Cleavage :—

$$\text{Adenine-Ribose—O—}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{—O—}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{—O—}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{—O}^- + H_2O \longrightarrow$$

ATP

$$\text{Adenine-Ribose—O—}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{—O}^- + {}^-\text{O—}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{—O—}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{—O}^- + 2H^+$$

AMP

$$\Delta G' = -8600 \text{ cal (pH 7.0)}$$

واخيرا فان نواتج هذه التفاعلات (أي ADP و AMP) تتحول ثانية الى ATP بفعل الطاقة الناتجة عن التفاعلات الايضية المنتجة للطاقة Exergonic Reactions .

2.3 مركبات فوسفات الاسيل Acyl Phosphate Compounds

ومن أبرز الامثلة على هذا النوع من المركبات الغنية بالطاقة هو حامض 1 , 3 — ثنائي فوسفو جليسريك ، اذ يكون تحلله المائي مصحوبا بانخفاض كبير في الطاقة الحرة .

$$\begin{matrix}\overset{O}{\|}\\ \text{C—O—}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{—O}^-\\ |\\ \text{HCOH}\\ |\\ CH_2OPO_3^{2-}\end{matrix} + H_2O \longrightarrow \begin{matrix}\overset{O}{\|}\\ \text{C—O}^-\\ |\\ \text{HCOH}\\ |\\ CH_2OPO_3^{-2}\end{matrix} + \text{HO—}\underset{\underset{O}{\|}}{\overset{\overset{O^-}{|}}{P}}\text{—O}^- + H^+$$

1,3-Diphosphoglyceric acid   3-Phosphoglyceric acid

$$\Delta G' = -11,800 \text{ cal (pH 7.0)}$$

2.3 مركبات الفوسفات الاينولية Enolic Phosphate Compounds

ويتبع لهذه المجموعة أكثر المركبات غنى بالطاقة وهو حامض فوسفواينول بيروفيك الذي يعطي عند تحلله مائيا طاقة حرة مساوية لـ 14,800 — سعرة عند pH = 7.0 . ويرجع السبب في كون هذا المركب من اكثر المركبات غنى بالطاقة الى الانخفاض الكبير في الطاقة الحرة المصاحبة لتحلله المائي وعملية الـ Tautomerization وكما هو مبين في الاتي :—

$$CH_2{=}C(CO_2^-){-}O{-}PO_3^{2-} + H_2O \xrightarrow{\Delta G = -6800} HO{-}PO_3^{2-} + CH_2{=}C(CO_2^-){-}OH \xrightarrow[\Delta G = -8000]{\text{Tautomerization}} CH_3{-}C({=}O){-}CO_2^-$$

Phosphoenol pyruvate — Pyruvate (unstable enol form) — Pyruvate (stable keto)

صورة الكيتو الثابتة صورة الاينول غير الثابتة

4.3 استرات الثيول Thiol Esters

ويعد مركب أستيل-كوا Acetyl-CoA من أبرز الامثلة على هذا النوع من المركبات الغنية بالطاقة • ويتحلل هذا المركب مائيا كالاتي :-

$$CH_3{-}C({=}O){-}S{-}CoA + H_2O \longrightarrow CH_3{-}C({=}O){-}O^- + CoA{-}SH + H^+$$

Acetyl~CoA — Coenzyme A

$\Delta G' = -7500$ cal (pH 7.0)

فوسفات الجوانيدينيوم Guanidinium Phosphates

ويعرف هذا النوع من المركبات باسم الفوسفاجينات Phosphagens حيث يوجـــــد بصـــــورة فوسفوكرياتين Phosphocreatine وفوسفوارجينين Phosphoarginine في عضلات الفقريات واللافقريات على التوالي •

$$^-O{-}P(O^-)({=}O){-}NH{-}C({=}{}^+NH_2){-}N(CH_3){-}CH_2{-}COO^-$$

Phosphocreatine

$$^-O{-}P(O^-)({=}O){-}NH{-}C({=}{}^+NH_2){-}NH{-}(CH_2)_3{-}CH(NH_3^+){-}COO^-$$

Phosphoarginine

ويتحلل هذا النوع من المركبات مائيا ويكون التفاعل مصحوبا بتغير في الطاقـــة الحرة مقداره 10,300 — سعرة وكما هو موضح في الاتي :-

$$O{=}P(O^-)_2{-}NH{-}C({=}\overset{+}{N}H_2){-}N(CH_3){-}CH_2{-}C({=}O){-}O^- + H_2O \longrightarrow {}^-O{-}P({=}O)(O^-){-}OH + NH_2{-}C({=}\overset{+}{N}H_2){-}N(CH_3){-}CH_2{-}C({=}O){-}O^-$$

فوسفوكرياتين — كرياتين

$\Delta G' = -10.300$ cal (pH 7.0)

4 مسارات انتقال مجاميع الفوسفات

تتم تفاعلات انتقال الفوسفات في الخلية بفعل الانزيمات حيث يؤدي فيها نظام ATP-ADP دورا يعد بمثابة الحلقة الرابطة الضرورية بين مركبات الفوسفات الغنية بالطاقة ومركبات الفوسفات ذات الطاقة الواطئة · وتنتقل مجاميع الفوسفات بفعل انزيمات متخصصة تقوم بتحفيز تفاعلات الانتقال التي تحدث في خطوتين أو تفاعلين ·

التفاعل الاول ، هو تفاعل انتقال مجاميع الفوسفات من المركبات الغنية بالطاقة الى ADP، بفعل انزيمات متخصصة من مجموعة الفوسفوترانسفيريزات وينتج عن هذه الخطوة ATP وفي التفاعل الثاني تعد ATP الناتجة بمثابة مانح الفوسفات Phosphate Donor لينتج مركب فوسفاتي ذو طاقة واطئة بفعل انزيم متخصص أيضا · وفيما يلي مثال على تفاعلات الانتقال هذه :-

$$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{ADP} \underset{\text{Kinase}}{\overset{\text{Pyruvate}}{\rightleftharpoons}} \text{Pyruvate} + \text{ADP}\ (1)$$

$$\text{ATP} + \text{D-Glucose} \overset{\text{Hexokinase}}{\rightleftharpoons} \text{ADP} + \text{D-Glucose-6-Phosphate}\ (2)$$

ويكون التفاعل الصاف كالاتي :-

$$\text{Phosphoenolpyruvate} + \text{D-Glucose} \rightleftharpoons \text{Pyruvate} + \text{D-Glucose-6-Phosphate}$$

ويلاحظ من هذه التفاعلات أن المحصلة النهائية هي انتقال مجموعة فوسفات من مركب غني بالطاقة (فوسفواينولبيروفات) الى مركب ذي طاقة واطئة (D — جلوكوز 6 ـ فوسفات) عبر نظام ATP-ADP الذي يعد وسيطا في تفاعلات الانتقال هذه · كما ينتج عن تفاعل الفسفرة رفع المحتوى الطاقي للجلوكوز · وعموما لا تحتوي الخلايا على انزيمات لتحفيز تفاعلات أنتقال مباشرة (بخطوة واحدة) للفوسفات من مركب غني بالطاقة (1 , 3 — ثنائي فوسفو جليسرات مثلا) الى مستقبل غني بالطاقة أيضا (بيروفات مثلا لتكوين فوسفو اينول بيروفات) · وكذلك بالنسبة لانتقال الفوسفات من مركب ذي طاقة واطئة (جليسرول 3 ـ فوسفات مثلا) الى مستقبل ذي طاقة واطئة (مثلا D- جلوكوز لتكوين D ـ جلوكوز 6 — فوسفات) · وهنا ينبغي ثانية تأكيد أهمية الدور الذي يلعبه نظام ATP-ADP كحلقة رابطة تجري عبرها تفاعلات انتقال الفوسفات في الخلية ·

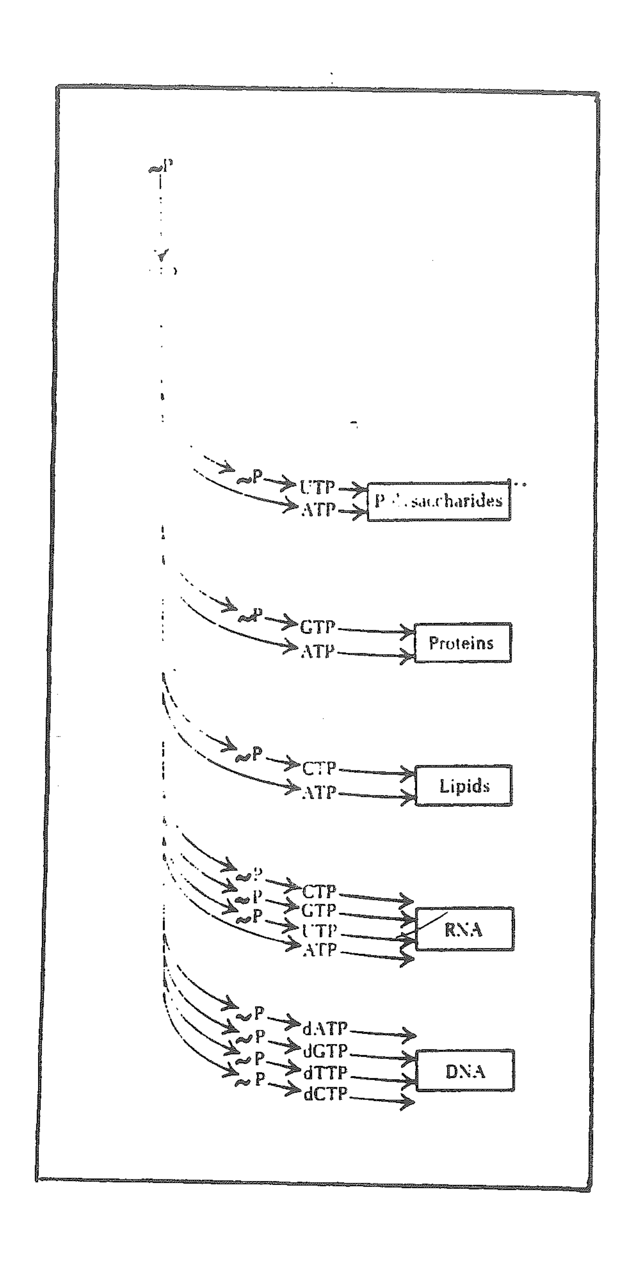
ومما يجدر الاشارة اليه قيام بعض الاحياء المجهرية بخزن مجاميع فوسفات غنية بالطاقة بصورة بوليمر فوسفاتي هو ميتافوسفات متعدد Polymetaphosphate الذي يكون ذا حجم غير محدود وتركيب مستقيم غير متفرع كما هو موضح في الاتي :ـ

$$\cdots O - \overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}} - O - \overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}} - O - \overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}} - O - \overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}} - O - \overset{\overset{O}{\|}}{\underset{\underset{O^-}{|}}{P}} - O \cdots$$

وتعرف هذه الحبيبات باسم الحبيبات الميتاكروماتية Metachromatic Granules حيث تتصبغ بصورة متميزة عند تصبيغها بالصبغات القاعدية • في حين يتم الحصول على مجاميع الفوسفات من الميتافوسفات المتعدد بفعل انزيمات متخصصة •

5. دور مركبات الفوسفات الغنية بالطاقة في مسارات التخليق الحيوي

اضافة الى الدور الذي يلعبه نظام ATP-ADP كناقل رئيس للفوسفات في عمليات وتفاعلات نقل الطاقة في الخلية ، فان مركبات أخرى نيوكليوسيدية ثنائية وثلاثية الفوسفات (رايبونيوكليوسيدات و 2- دي اوكسي رايبونيوكليوسيدات) تشترك أيضا في نقل الطاقة في الخلية • اذ تقوم هذه المركبات بامداد تفاعلات معينة في مسارات التخليق الحيوي بمجاميع فوسفاتية غنية بالطاقة فضلا عن أن بعضها يعد مركبات أولية أو مولدات Precursors في تخليق RNA كما هو موضح في الشكل (2.2) • ويقوم انزيم نيوكليوسيد داي فوسفوكينيز بربط مسارات امداد الطاقة لهذه المركبات مع ATP، اذ يحفز هذا الانزيم تفاعلات من النوع الموضح في الشكل (3.2) • ومن المعروف عن هذا الانزيم انه يتواجد في المايتوكوندريا والجزء الذائب من السايتوبلازم • كما يلاحظ أنه غير متخصص نسبيا بالنسبة لمواد تفاعله • اذ يقوم بتحفيز انتقال مجاميع الفوسفات بين ATP واي نيوكليوسيد ثنائي الفوسفات (XDP) وكذلك بين أي نيوكليوسيد ثلاثي الفوسفات(XDP) ونيوكليوسيد ثنائي الفوسفات (XDP) بغض النظر عن نوع القاعدة النتروجينية •



الشكل (2.2) امداد مسارات التخليق الحيوي المختلفة
بمجاميع الفوسفات ذات الطاقة العالية ٠

$$ATP + UDP \rightleftharpoons ADP + UTP$$

$$ATP + GDP \rightleftharpoons ADP + GTP$$

$$ATP + CDP \rightleftharpoons ADP + CTP$$

$$GTP + UDP \rightleftharpoons GDP + UTP$$

$$ATP + dCDP \rightleftharpoons ADP + dCTP$$

$$GTP + dADP \rightleftharpoons GDP + dATP$$

الشكل (3.2) التفاعلات التي يحفزها انزيم نيوكليوسيد داي فوسفوكينيز

Nucleoside diphospho kinase

الفصل الثالث

الايض اللاهوائي للكربوهيدرات

Anaerobic Metabolism of Carbohydrates

1. مقــــدمة
2. مراحل التحلل الجلايكولي
3. تغيرات الطاقة في التحلل الجلايكولي
4. استخدام كربوهيدرات أخرى في التحلل الجلايكولي
5. تنظيم التحلل الجلايكولي



1 . مقدمة

تعد الكربوهيدرات ، سواء كانت بهيئة سكريات أحادية أو ثنائية أو متعددة ، مصدر الطاقة الرئيس للكائنات الحية . اذ تقوم الخلايا باستخلاص الطاقة الكيمياوية من الجلوكوز أو جزيئات أخرى تعمل كجزيئات وقود **Fuel Molecules** بغياب الاوكسجين الجزيئي أي بمعزل عن الهواء . وتتشابه الاحياء الهوائية واللاهوائية في المراحل الاولية من المسار وذلك بعدم حصول اكسدة صافية **Net Oxidation** للجزيئة الوقودية بل تكون الحالة التأكسدية **Oxidation State** للنواتج بنفس مستوى الحالة التأكسدية للجزيئة الوقودية (عملية التخمر) . والمعروف أن الاحياء اللاهوائية تقسم الى قسمين :ـ الاحياء اللاهوائية اجبارا **Obligative anaerobes** والاحياء اللاهوائية اختيارا **Facultative anaerobes** . اذ تعد الاحياء اللاهوائية اجبارا هي الاكثر بدائية (من ناحية التطور) وتضم أنواعا قليلة من البكتريا مثل بكتريا الميثان وبكتريا النتروجين وبكتريا الكلوستيريديا **Clostridia** وبعض اللافقريات الواطئة . أما الاحياء اللاهوائية اختيارا فانها تضم عددا كبيرا من الانواع والاجناس المختلفة من ضمنها بكتريا حامض اللاكتيك والخميرة . وعند نمو هذه الاحياء تحت الظروف اللاهوائية فانها تحصل على الطاقة الضرورية لفعالياتها المختلفة من تخمير الجلوكوز بعمليات مماثلة أو مشابهة لتلك التي تحدث في الاحياء اللاهوائية اجبارا . أما عند نموها هوائيا فانها تستمر في تكسير الجزيئات الوقودية من خلال المسار اللاهوائي ومن ثم اكسدة نواتجه بفعل الاوكسجين الجزيئي . وبكلمة أخرى يكون المسار اللاهوائي في الاحياء الاختيارية بمثابة مرحلة اولى اجبارية تجري قبل المسار الهوائي (التنفس) . ويعد هذا التسلسل في المسارات بمثابة سمة مميزة ليس فقط للعديد من البكتريا والخمائر والاعفان وانما أيضا للنباتات والحيوانات الراقية .

ومن أكثر الجزيئات الوقودية شيوعا في التخمر اللاهوائي هي السكريات السداسية وخاصة D ـ جلوكوز ، ويمكن تقسيم انواع تخمر الجلوكوز الى قسمين اساسيين :

1. التخمر اللاكتيكي المتجانس Homolactic Fermentation :

يتم في هذا النوع من التخمر تكسير جزيئة الجلوكوز السداسية الكربون الى جزيئتين من حامض اللاكتيك الثلاثي الكربون كناتج وحيد :

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{Glycolysis}} 2\ CH_3CHOHCOOH$$

ويصطلح على تسمية هذا النوع من مسارات تكسير الجلوكوز بالتحلل الجلايكولي Glycolysis ونعني انحلال السكر Dissolution of Sugar · ويلاحظ وجود هذا المسار في العديد من انواع الاحياء المجهرية ·

2 . التخمر الكحولي Alcoholic Fermentation :

ويتم في هذا النوع من التخمر تكسير جزيئة الجلوكوز الى جزيئتي كحول اثيلي ثنائية الكربون وجزيئتي ثاني أوكسيد الكربون ·

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow[\text{Fermentation}]{\text{Alcoholic}} 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2$$

ويتم التخمر الكحولي بفعل نفس المسار الانزيمي للتحلل الجلايكولي وبزيادة خطوتين انزيميتين اضافيتين يجري بواسطتهما تكسير النواتج الثلاثية الكربون الناتجة من تكسير الجلوكوز وتحويلها الى كحول اثيلي وثاني اوكسيد الكربون ·

ان معظم انواع تخمر الجلوكوز الاخرى ما هي الا تحويرات في المسار الاساس للتحلل الجلايكولي وذلك تبعا لنوع الكائن الحي · فالتخمر اللاكتيكي المختلط أو غير المتجانس Heterolactic or Mixed Lactic Fermentation يعطي نواتج نهائية تشتمل على جزيئة واحدة من كل من حامض اللاكتيك والكحول الاثيلي وثاني اوكسيد الكربون · كذلك ينتج في بعض انواع تخمر السكريات حامض البروبيونيك وحامض البيوتيريك وحامض السكسينيك والاسيتون كنواتج نهائية ·

2 . مراحل التحلل الجلايكولي

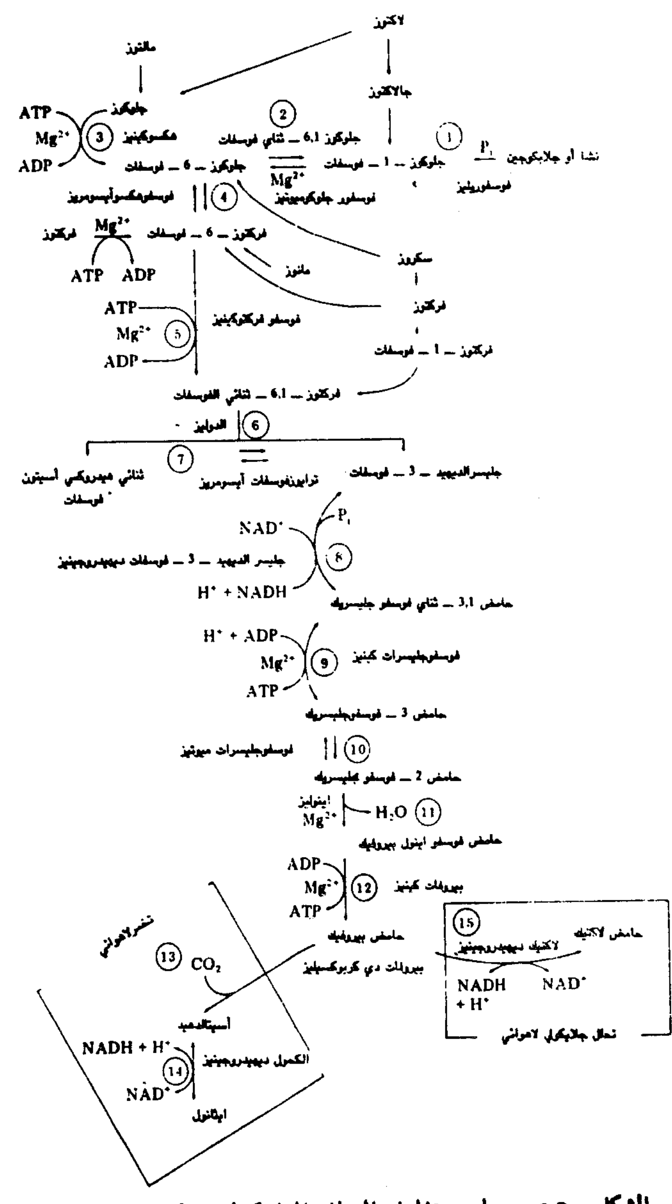
تشترك في تحفيز تفاعلات مسار التحلل الجلايكولي مجموعة مؤلفة من أحد عشر انزيما تسير تفاعلاتها بصورة متعاقبة ومتصلة · ويمكن تقسيم تفاعلات المسار الى مرحلتين :

1. المرحلة الاولى :ـ وتشمل تجميع السكريات البسيطة وتحويلها الى جليسرالدهيد 3 — فوسفات حيث تستهلك فيها جزيئتا ATP ·

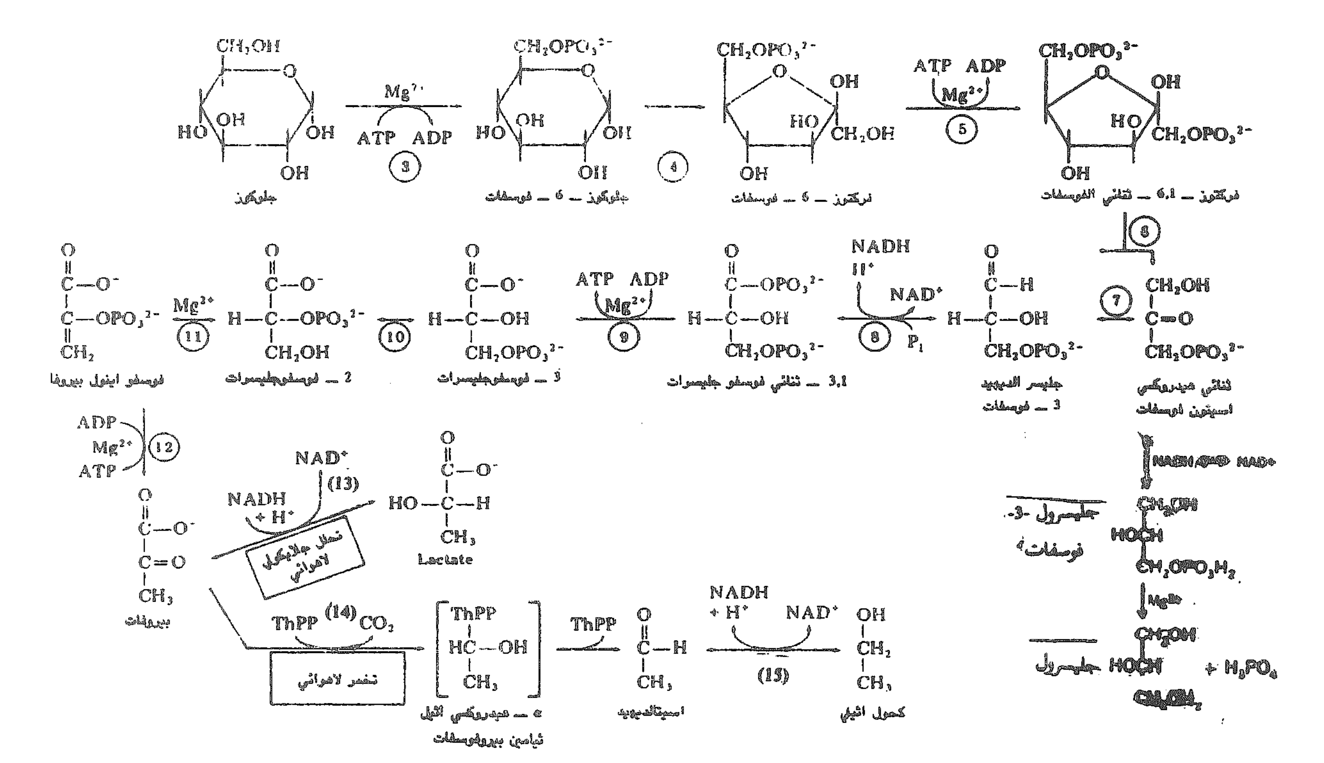
2. المرحلة الثانية :- وتشمل تفاعلات الاكسدة والاختزال التي يرافقها انتاج ATP وحامض اللاكتيك أو الكحول الاثيلي وثاني اوكسيد الكربون تبعا لنـــوع المسار ٠

ومن المفيد تثبيت الملاحظات التالية حول مساري التحلل الجلايكولي والتخمر الكحولي الموضحين في الشكل (1.3) والشكل (2.3) ٠

1. تماثل التفاعلات التي يتكون منها كلا المسارين بدءا بالمركب جلوكوز .. -6- فوسفات ولغاية حامض البيروفيك ٠ ويختلف المساران في كيفية تحـويل حامض البيروفيك وكذلك في الاساليب المتبعة في اعـادة تحويـل NADH الى NAD^+ ٠ اذ يكـــون التفاعـــل بين البيروفات و NADH في التحلل الجلايكولي تفاعلا مباشرا بوجود انزيـم لاكتات ديهيدروجينيز وينتج عـن هذا التفاعل حامض اللاكتيك واعادة تكوين NAD^+ (التفاعل 13) ٠ أما في التخمر الكحولي فيتم اولا تفاعل ازالة الكربوكسيل من حامض البيروفيك ليتحول الى اسيتالدهيد (التفاعل 14) ومن ثم اختزال الاسيتالدهيد المتكون الى كحول بواسطة NADH (التفاعل 15) ٠
2. يعد التفاعــل (6) من التفاعلات التي يمتــاز بها المسار ، اذ يتـم فيه كسر رابطة C – C ويتحول على أثرها سكر من نوع كيتوهكسوز ـ ثنائي الفوسفات الى جزيئتين من ترايوز-فوسفات الثلاثي بفعل انزيم آلدوليز ٠
3. ان تفاعل الاكسدة والاختزال المتميز في المسار هو التفاعل (8) الذي يتحول فيه جليسرالدهيد 3 — فوسفات الى 1 , 3 — ثنائي فوسفوجليسرات ، والمركب الاخير يعد من المركبات الغنية بالطاقة (راجع الفصل الثاني من هذا الباب) ٠ ويقـوم بتحفيز هـذا التفاعـل انزيـم D- جليسرالدهيد - 3- فوسـفات ديهيدروجينيز ، وأيضا يشترك في التفاعل NAD^+ والفوسفات اللاعضوية ٠ وكذلك فان التفاعل (7) يضمن حدوث التحويل المتبادل Interconversion لجزيئتي ترايوز فوسفات الناتجة من التفاعل (6) مما يؤمن اشتراكهما في التفاعل (8) ٠
4. ان دخول كل جزيئة جلوكوز في المســار يرافقــه اسـتهلاك جزيئتي ATP (التفاعل 3 و 5)) وانتاج أربعة جزيئات (جزيئة لكل سكر ثلاثي في



الشكل 1.8 مساري تفاعل التحلل الجلايكولي والتخمر الكحولي



الشكل 23 التراكيب والانزيمات والمعاونات للتحلل الجلايكولي والتخمر الكحولي

التفاعل 9 وكذلك في التفاعل 12) • أما عند بدء المسار بالنشا فــان جزيئة واحدة من ATP تستهلك لكل وحدة سكر سداسي (جلوكوز) • وعليه فان النــاتج الصــافي للعمليــة الاولى (المبتدئــة بالجلوكوز) هــو تكوين جزيئتي ATP لكل وحدة سكر سداسي ، في حين تعطي العملية الثــــانية (المتبدئة بالنشا) ثلاث جزيئات من ATP لكل وحدة من السكر السداسي • وكذلك يتم استهلاك جزيئتي فوسفات لا عضوية عند بدء المسار بالجلوكوز وثلاثة جزيئات عند بدئه بالنشا •

5. تراكم النواتج النهائية (حامض اللاكتيك أو الكحول الاثيلي وثاني أوكسيد الكربون) تحت الظروف اللاهوائية ، اذ ان الوسيلة الفعالة للتخلص منها هي أكسدتها أكسدة تامة الى ثاني أوكسيد الكربون والماء • ويجرى توفيــــر الظروف الهوائية لعملية الاكسدة في الخلية التي تستطيع القيام بها (كما في الخميرة) •

3 . تغيرات الطاقة في التحلل الجلايكولي

يمكن حساب تغير الطاقة الحرة $\triangle G'$ لتحول مول واحد من الجلوكوز الى مولين من حامض اللاكتيك عند حدوثه خارج الخلية (في أنبوبة اختبار مثلا) وذلك بتطبيق معلومات واساسيات الديناميكا الحرارية المختلفة وذلك كالاتي :ــ

$$\underset{\text{جلوكوز}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{(في أنبوبة اختبار)}} \underset{\text{حامض اللاكتيك}}{2\ CH\,CHOHCOOH} \quad \triangle G' = -47.000\ cal.$$

واذا أهملنا تغيرات الانتروبي Entropy فان هذا المقدار من الطاقة سوف يتحــرر بصورة حرارة ($\triangle H$) الا أنه من الواجب تصحيح هذا التفاعل عند حدوثه فــي الخلية وذلك لان الجلوكوز يتحول الى مولين حامض اللاكتيك وينتج مولين ATP من ADP وفوسفات لا عضوية :ــ

$$C.H.O. + 2\ ADP - 2\ H\,PO \xrightarrow{\text{(في الخلية)}} 2\ CH\,CHOHCOOH + 2\ ATP + 2\ H\,O$$

$$\triangle G' = -32{,}4\,0\ cal.$$

ولمعرفة هذا الفارق في تغير الطاقة الحرة بين التفاعلين ينبغي أن نتذكر بأن كل ATP تنتج تمثل طاقة محفوظة تعادل 7300 سعرة ، أي أن مقدار الطاقة المحفوظة بصورة ATP يساوي : $2 \times 7300 = 14600$ سعرة ·

في حين مقدار التغير في الطاقة الحرة للتفاعل الثاني هو :

$$- 47000 - (- 14600) = - 32400 \text{ cal.}$$

اما كفاءة انتاج ATP وحفظ الطاقة في التحلل الجلايكولي فيتم حسابه كالاتي :ـ

$$\frac{- 14600}{- 4700} \times 100 = 31 \%$$

وعند تحويل الجلوكوز الى كحول اثيلي وثاني اوكسيد الكربون خارج وداخل الخلية فان تغيرات الطاقة الحرة تكون كما يلي :ـ

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{(في انبوبة اختبار)}} 2\,CH_3CH_2OH + 2CO_2 \quad \Delta G' = -40000 \text{ cal.}$$

$$C_6H_{12}O_6 + 2\,ADP + 2\,H_3PO_4 \xrightarrow[\text{(الخميرة مثلا)}]{\text{(في الخلية)}} 2\,CH_3CH_2OH + 2\,CO_2 + 2\,ATP + 2\,H_2O$$

$$\Delta G' = -25400 \text{ cal.}$$

ويتم حساب الكفاءة بنفس الطريقة السابقة ·

4. استخدام كربوهيدرات أخرى في التحلل الجلايكولي

لا يقتصر مسار التحلل الجلايكولي على الجلوكوز فقط بل يتعداه الى سكريات اخرى يتم تأيضها خلال المسار وذلك بعد تحويلها الى مركبات وسطية بفعل انزيمات متخصصة · فالفركتوز والمانوز على سبيل المثال ، يتم فسفرتهما وتحويلهما الى فركتوز ـ 6 ـ فوسفات ومانوز ـ 6 ـ فوسفات على التوالي بواسطة ATP وبفعل انزيم هكسوكينيز · ونظرا لكون فركتوز ـ 6 ـ فوسفات من المركبات الوسطية في مسار التحلل الجلايكولي فانه يدخل المسار مباشرة · في حين يتحول مانوز ـ 6 ـ فوسفات الى فركتوز ـ 6 ـ فوسفات بفعل انزيم فوسفو مانوز ايسوميريز · وتتحلل السكريات الثنائية مائيا بفعل انزيمات متخصصة من مجموعة الجلايكوسيديزات

مثل اللاكتيز (يحلل اللاكتوز مائيا) والانفرتيز (يحلل السكروز مائيــا) الى السكريات الاحادية المكونة لها • وتدخل نواتج التحلل المائي للسكروز (جلوكوز + فركتوز) المسار كما سبق توضيحه ، في حين يجري أيض الجالاكتوز الناتج عن التحلل المائي لسكر اللاكتوز (اضافة الى الجلوكوز) بصورة مغايرة لايض المانوز والفركتوز • اذ تشمل الخطوة الاولى فسفرة الجالاكتوز بواسطة ATP وبفعــل انزيم جالاكتوكينيز متخصص وبالتالي تحويله الى جالاكتوز-1 - فوسفات كالاتي :-

Galactose + ATP ⟶ Galactose-1-phosphate + ADP

وبعد ذلك يجري تحويل جالاكتوز-1 — فوسفات الى UDP -جالاكتوز . الموضــح تركيبه ادناه ، بواسطة ثلاثي فوسفات اليوريدين UTP وبوجود انزيم UDP — جالاكتوز بيروفوسفوريليز :-

Uridine diphosphate galactose
(UDP-galactose)

Gal—P + U—R—P—P—P ⇌ U—R—P—P—Gal + P—P

Galactose-1-phosphate, UTP, UDP-galactose, Pyrophosphate

حيث أن U = يوريدين و R = رايبوز و P = فوسفات •

وتتضمن الخطـوة الثـالثة عمليـة تحويـل ايسومرية Isomerization للجالاكتوز الموجود في UDP - جالاكتوز الى الجلوكوز ، اذ يتحول UDP - جالاكتوز الى UDP - جلوكوز بفعل انزيم UDP - جلوكوز ابيميريز كالاتي :-

UDP-galactose ⇌ UDP-glucose

وفي الخطوة الاخيرة يتحرر الجلوكوز (سابقا الجالاكتوز) من UDP - جلوكوز بفعل انزيم UDP - جلوكوز بيروفوسفوريليز وذلك بصورة جلوكوز-1-فوسفات الذي يدخل بدوره في مسار التحلل الجلايكولي :

U—R—P—P—Glu + P—P ⇌ U—R—P—P—P + Glu—P

UDP-glucose · UTP · Glucose-1-phosphate

5. تنظيم التحلل الجلايكولي

تحتاج الخلية الى مستوى جيد من السيطرة على التحلل الجلايكولي لضمان الحصول على الطاقة من الكربوهيدرات فقط عند الحاجة اليها ، اذ يبدي الاوكسجين الجزيئي تأثيرا مثبطا على المسار اي على تحويل الجلوكوز الى حامض اللاكتيك ، أو الكحول الاثيلي وثاني اوكسيد الكربون ، ويعرف تأثير الاوكسجين هذا باسم « تأثير باستور Pasteur Effect » ، و لايقتصر هذا التأثير في الاحياء اللاهوائية بل يتعداها الى الاحياء والانسجة الهوائية التي تستطيع اكسدة حامض البيروفيك اكسدة تامة الى ثاني اوكسيد الكربون والماء ، اذ يمكن لمثل هذه الاحياء الاستفادة من الجلوكوز في غياب الاوكسجين الجزيئي بصورة أفضل مما في وجوده ، ان هذا التأثير التثبيطي للاوكسجين يعود الى المقدار الكبير من الطاقة المتاحة بشكل ATP عند أكسدة الجلوكوز هوائيا الى ثاني اوكسيد الكربون والماء مقارنة بالطاقة الناتجة عن تحويل الجلوكوز لا هوائيا الى حامض اللاكتيك أو الكحول الاثيلي وثاني اوكسيد الكربون ، وينجم عن هذا الفرق في مقدار ATP الناتجة حاجة أقل لاستهلاك الجلوكوز المطلوب لاداء النشاطات وتسيير العمليات الحيوية في الخلية وبالتالي تثبيط سرعة المسار بوجود الاوكسجين الجزيئي ،



الفصل الرابع

مسار فوسفات البنتوز

Pentose Phosphate Pathway

---

1. مقـــدمة
2. مراحل مسار فوسفات البنتوز
3. مسار انتنر دودوروف Entner-Doudoroff
4. مسار الجلوكيورونات Glucuronate
5. مسارات تخمرية أخرى



1. مقدمه

لقد أطلق على مسار فوسفات البنتوز عدد من التسميات في فترات زمنية متباينة منها : مسار حامض الفوسفوجلوكونيك Phosphogluconic acid pathway دورة الهكسوز احادي الفوسفات Hexose monophosphate "Shunt" دورة البنتوز Pentose cycle ۰ وأيا كانت التسمية فان هذا المسار يعد من مسارات أيض الكربوهيدرات الرئيسة في الخلايا ۰ وتتلخص الوظائف التي يقوم بها هذا المسار في الاتي :ــ

1 - يقوم هذا المسار بامداد الخلية بـ NADP مختزل(NADPH)الذي له دور أساس في تفاعلات التخليق الحيوي (مثل تخليق الاحماض الدهنية والستيرويدات) ۰

2. في حالة اكسدة جميع NADPH بصورة تامة ينتج 36 جزيئة ATP لكل جزيئة جلوكوز تتم اكسدتها ۰ الا ان الشائع عادة هو الحصول على الطاقة من اكسدة NADH والاستفادة من NADPH في تفاعلات التخليق الحيوي ۰

3. ان بعض تفاعلات المسار تعد مصدرا للبنتوزات التي تدخل في تركيب النيوكليوتيدات ۰

4. ان هذا المسار يجعل من التحويل المتبادل interconversion بين الهكسوزات والبنتوزات ممكنا ۰

وسنتناول في هذا الفصل السمات المهمة لخطوات ومراحل المسار اضافة الى بعض المسارات ذات العلاقة والتي توجد في بعض الاحياء المجهرية ۰

2. مراحل مسار فوسفات البنتوز

يمكن تقسيم تفاعلات هذا المسار الى قسمين اساسيين هما :ــ

أ) التفاعلات التأكسدية غير المتعاكسة Irreversible Oxidative Reactions

ب) التفاعلات غير التأكسدية المتعاكسة Reversible Non Oxidative Reactions

اذ أن التفاعلات الثلاث الاولى في المسار والتي تحفزها انزيمات جلوكوز ـ 6 ـ فوسفات ديهيدروجينيز و 6 ــ فوسفوجلوكونولاكتونيز و 6 ــ فوسفو جلوكونات ديهيدروجينيز هي تفاعلات تأكسدية غير متعاكسة كما هو موضح في الشكل

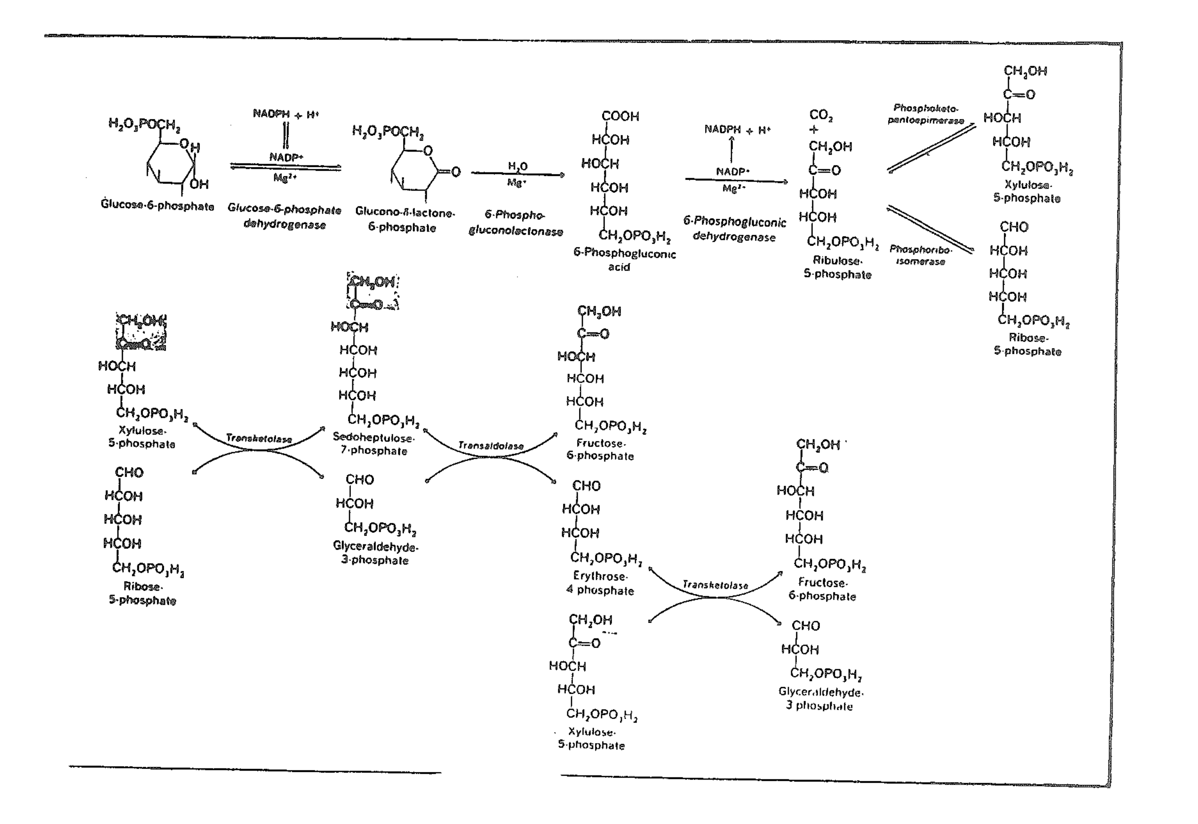
(1.4) • ويلاحظ أيضا اختزال جزيئتي NADP الى NADPH لكل جزيئة جلوكوز فوسفات تدخل المسار • ان التفاعل الاول في المسار مكتوب بصورة تفاعل متعاكس وذلك لان اكسدة NADPH يمكن ان تتم بوجود الانزيم الذي يحفز التفاعل (جلوكوز 6 — فوسفات ديهيدروجينيز) وناتج التفاعل (6 — فوسفوجلوكونو - δ - لاكتون) الا أن اللاكتون الناتج يكون قلقا ويتحلل مائيا بصورة تلقائية ليعطي حامض 6 — فوسفوجلوكونيك • ويكون تفاعل التحلل المائي هذا الذي يحفزه انزيم 6 — فوسفوجلوكونولاكتونيز تفاعلا غير متعاكس • ومن أساليب السيطرة الايضية الملاحظة على التفاعل الاول هي كون NADPH والاحماض الدهنية بمثابة مثبطات لانزيم جلوكوز-6 — فوسفات ديهيدروجينيز •

أما التفاعلات التي تتبع النوع الثاني (أي التفاعلات غير التأكسدية المتعاكسة) فتبدأ بالتفاعل الرابع الذي يحفزه انزيم فوسفو رايبوز أيسوميريز ولغاية نهاية المسار • وتوضح الاجزاء المضللة في الشكل (1.4) مجاميع الكيتول التي يتم انتقالها بفعل انزيم ترانس كيتوليز ومجاميع داي هيدروكسي أستيون التي يتم انتقالها بفعل انزيم ترانس الدوليز • ويبين الجدول (1.4) الكيتوزات المانحة والالدوزات المستقبلة لمجاميع الكيتول والتي يقوم انزيم ترانس كيتوليز بتحفيز عملية انتقالها •

الجدول (1.4)

الكيتوزات والالدوزات التي يحفز انزيم ترانس كيتوليز انتقال مجاميع الكيتول فيما بينها

الكيتوزات (مانحات الكيتول)	الالدوزات (مستقبلات الكيتول)
D زايلوز -5- فوسفات	D- رايبوز -5- فوسفات
D- فركتوز -6- فوسفات	D- جليسرالدهيد -3- فوسفات
D- سيدوهبتيولوز -7- فوسفات	D- اريثروز -4- فوسفات



الشكل (1.4) مسار فوسفات البنتوز

اضافة الى وظائف المسار التي ورد ذكرها في بداية الفصل فان بعض النـواتج والمركبات الوسطية فيه تؤدي دورا مهما في مسارات وتفاعلات أيضية أخرى . اذ يعد NADPH العامل المختزل في تفاعل اختزال الجلوكوز الى سوربيتول ، واختزال حامض داي‌هيدروفوليك الى حامض تتراهيدروفوليك ، واختزال حامض جلوكيورونيك الى حامض L — جلوكونيك . وكذلك يدخل NADPH في تفاعل أضافة الكربوكسيل الاختزالي Reductive carboxylation لحامض البيروفيك الذي يتحول الى حامض الماليك بفعل انزيم الماليك Malic enzyme . كما أن للـ NADPH دورا متميزا في تفاعلات اضافة الهيدروكسيل Hydroxylation التي تتم في مسارات تخليق الاحماض الدهنية غير المشبعة وتحويل الحامض الاميني فنيل ،لانين الى تيروسين ، وفي تكوين بعض الستيرويدات . أما سكر الرايبوز فان الخليـة تحتاجه في تفاعلات التخليق الحيوي للاحماض النووية والنيوكليوتيدات . وتحتاج الاحياء المجهرية الى سكر أريثروز-4 — فوسفات في الخطوة الاولى من مسار التخليق الحيوي الذي يقود الى تكوين حامض الشيكيميك Shikimic acid ومن ثم الى عدد من الاحماض الامينية . فضلا عن ذلك يعد فركتوز-6 — فوسفات وجليسرالدهيد — 3 - فوسفات المتكونان بفعل انزيم ترانس كيتوليز من المركبات الوسطية في مسار التحلل الجلايكولي .

3 . مسارا انتنر دودوروف Entner-Doudoroff

يقتصر وجود هذا المسار (الى حد الان) على بعض أنواع البكتريا وخاصـة *Azotobacter* spp. , *Pseudomonas* spp. حيث يلاحظ افتقارها الى انزيم فوسفو فركتو كينيز الامر الذي يفقدها القدرة على تكسير الجلوكوز بواسطة مسار التحلل الجلايكولي . وتستطيع مثل هذه الاحيـاء المجهرية القيـام بالايض الهدمي للجلوكوز وذلك بتحويله الى حامض 6 — فوسفوجلوكونيك بواسطة انزيمي جلوكوز - 6 - فوسفات ديهيدروجينيز و 6 - فوسفوجلوكولو لاكتونيز على التوالي . ويعقب تكوين حامض 6 - فوسفوجلوكونيك التفاعلات التالية :-

COO^-
|
H-C-OH
|
HO-C-H
|
H-C-OH
|
H-C-OH
|
$CH_2OPO_3^{2-}$

6 - فوسفوجلوكونات
ديهيدروجينيز
→
Fe^{2+} . GSH

COO^-
|
C - OH
||
C - H
|
H-C-OH
|
H-C-OH
|
$CH_2OPO_3^{2-}$

$+ H_2O$

↓

COOH
|
C = O
|
H-C-H
- - - - - - - - - - - - - - - -
H-C-OH
|
H-C-OH
|
$CH_2OPO_3^{2-}$

2 - كيتو - 3 - دي اوكسي - 6 - فوسفوجلوكونات

2 - كيتو 3 - دي اوكسي 6 - فوسفوجلوكونات الدولين
↓

COO^-
|
C = O
|
CH_3

بيروفات

+

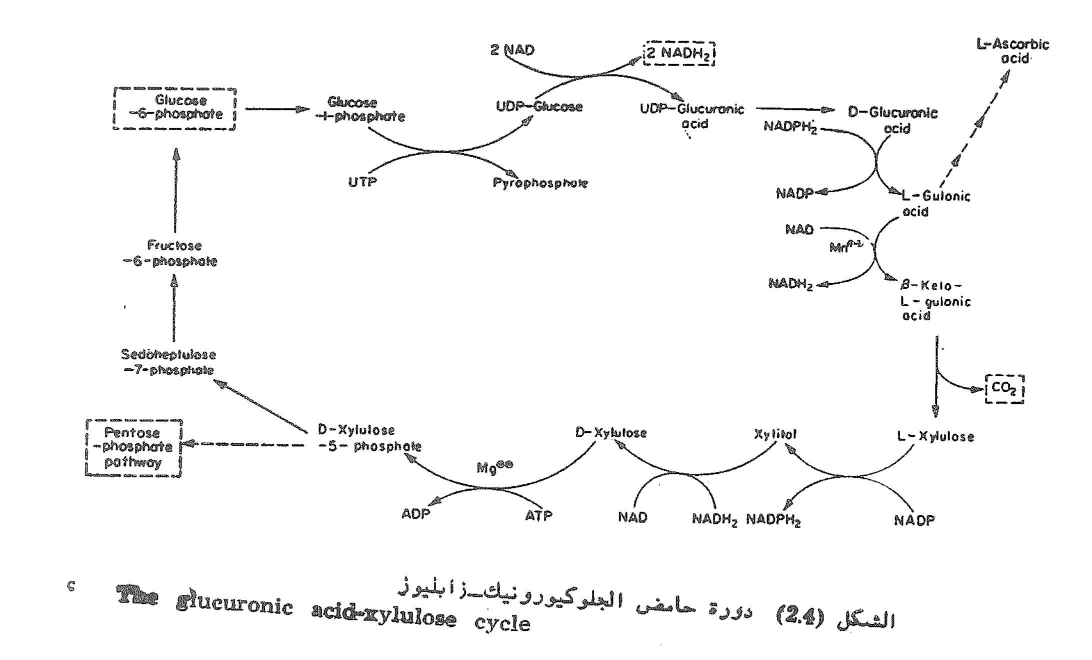
CHO
|
H-C-OH
|
$CH_2OPO_3^{-2}$

جليسر الدهيد
3 - فوسفات

ويلاحظ من هذه التفاعلات ان الخلية تتمكن بواسطتها من تكسير الجلوكوز الى بيروفات وجليسرالدهيد -3- فوسفات دون المرور بالتحلل الجلايكولي . اضافة الى ذلك فان هذا المسار يسمح باستغلال سكريات أخرى كالجالاكتوز واحماض سكرية مثل حامض D — جلوكيورونيك وحامض D — جالاكيتورونيك .

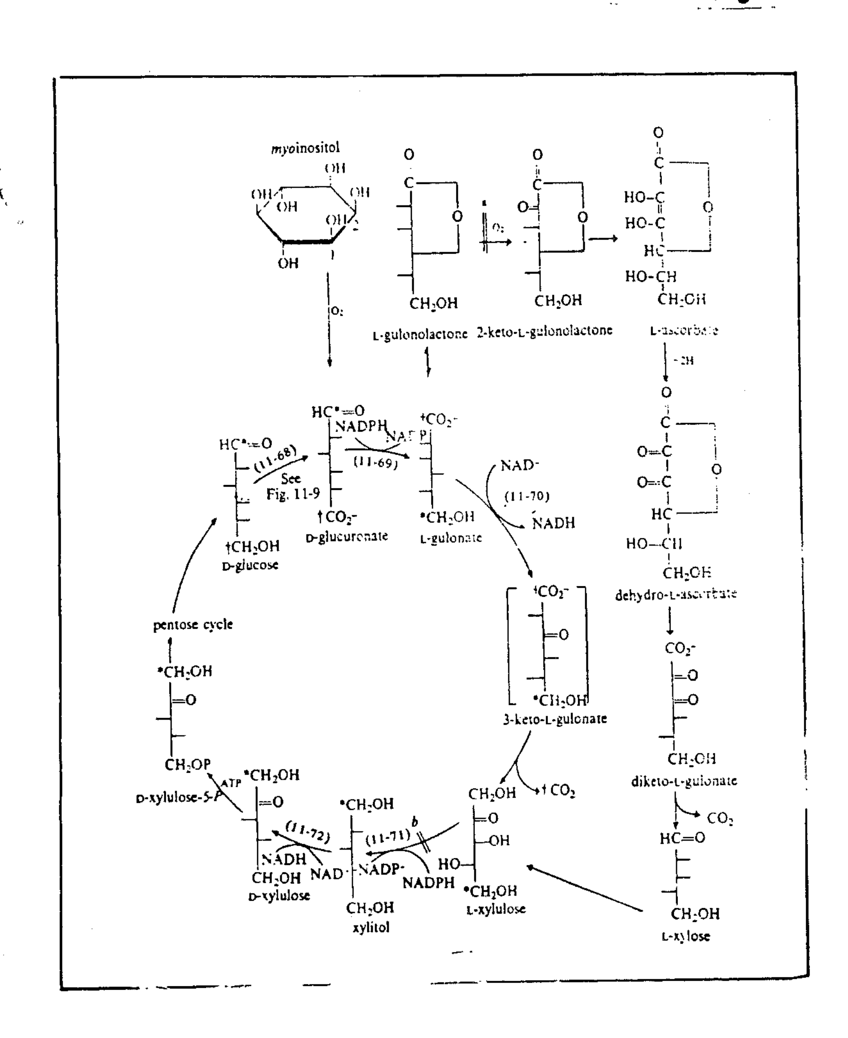
4. مسار الجلوكيورونات Glucuronate Pathway

ان لهذا المسار تسمية أخرى هي دورة حامض الجلوكيورونيك-زايليولوز Glucuronic Acid-Xylulose Cycle . ويختلف هذا المسار عن مسار فوسفات البنتوز في أن معظم مركباته الوسطية تكون غير مفسفرة . اذ أن الغاية من هذا المسار هو تكسير الجلوكوز بواسطة فقدان ذرة الكربون السادسة بدلا عن الاولى . ويلاحظ من الشكل (2.4) ان كل دورة من دورات المسار تستهلك جزيئة UTP واحدة لتكوين UDP — جلوكوز وجزيئة واحدة من ATP لتكوين D — زايليولوز-5 — فوسفات كذلك ينتج مول واحد من NADH في تفاعل ازالة الهيدروجين من UDP —جلوكوز . أما بقية عمليات انتقال الهيدروجين فانها لا تسبب تغيرا اجماليا في تركيز NAD^+ أو $NADP^+$ نظرا لوجود نوع من التعويض الذاتي بين تفاعلات الهدرجة وتفاعلات ازالة الهيدروجين .



الشكل (2.4) دورة حامض الجلوكيورونيك_زايليوز
The glucuronic acid-xylulose cycle

وتتجلى أهمية هذا المسار في احتوائه على العديد من المركبات الوسطية التي تتحول الى نواتج مشتقة من السكريات بواسطة مسارات فرعية كما هو موضح في الشكل (3.4) .



الشكل (3.4) مسارات D ــجلوكيورونات-L ــ جولونات

D-Glucuronate-L-gulonate Pathways

ومن أبـرز المركبات التي ترتبـط بهـذا المسـار هـو حامض الجـولونيك gulonic acid الذي يعد من المركبات الوسطية في أيض حامض الاسكوربيك ٠ فضلا عن ذلك يمكن للمركب مايواينوسيتول ان يدخل المسار بعد أن يتأكسد الى D – جلوكيورونات ٠ وأخيرا ، من المفيد الاطلاع على مسارات الايض الهـدمي للجلوكوز التي وردت في هذا الباب والتحولات الرئيسة لكل منها كما هو موضح في الشكل (4.4) ٠ اذ يبين المخطط ارقام ذرات الكربون التي تشترك في التغيرات الرئيسة التي تطرأ على جزيئة الجلوكوز اضافة الى تحديد المسارات التي يلاحظ وجودها في الاحياء المجهرية ٠

5. مسارات تخمرية اخرى

يمتلك العـديد من الاحيـاء المجهـرية وخاصـة تلك التابعـة الى جنس Propionibacteria القدرة على انتاج حامض السكسينيك والبروبيونيك من كل من الجلوكوز ، والجليسرول ، واللاكتات ، والبيروفات ٠ وتوضح المعادلات التالية توازن الكربون في المسارات التي تقود الى تكوين هذين الحامضين :

$$2\ \text{Hexose} \longrightarrow 4\ \text{Propionic acid} + 2\ \text{Acetic acid} + 2\ CO_2$$

$$\text{Glycerol} \longrightarrow \text{Propionic acid} + H_2O$$

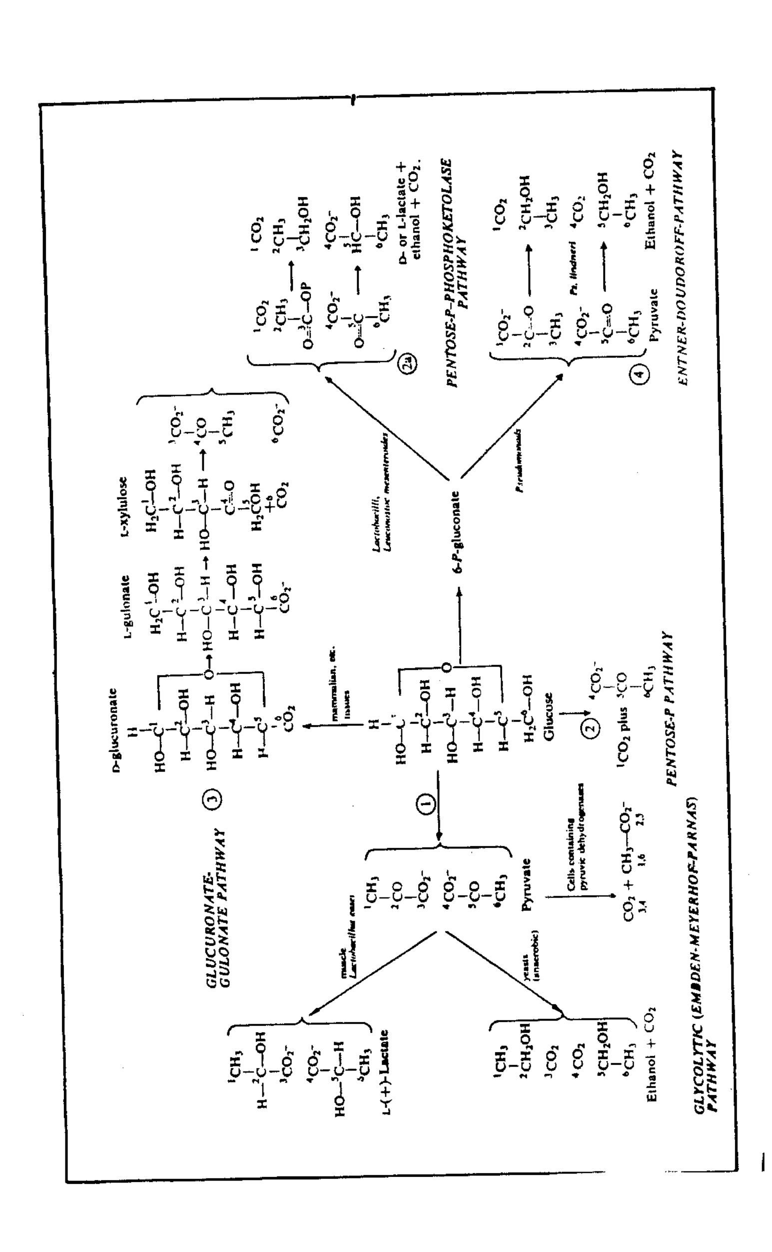
$$3\ \text{Lactic acid} \longrightarrow 2\ \text{Propionic acid} + \text{Acetic acid} + CO_2$$

$$\text{Hexose} + 2\ CO_2 + 4\ [H] \longrightarrow 2\ \text{Succinate} + 2\ H_2O$$

(من مسارات أخرى)

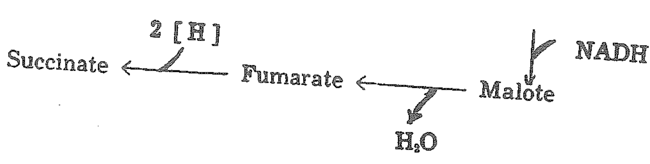
$$\text{Glycerol} + CO_2 \longrightarrow \text{Succinate} + H_2O$$

وتكون الخطوات الاساسية في المسارات التخمـرية التي تنتـج حامض السكسينيك كالاتي :ـ



الشكل (4.4) مسارات الايض الهدمي الرئيسة للجلوكوز

$$\text{Pyruvate} \xrightarrow[\text{AMP, PPi}]{\text{ATP, Pi}} \text{Phosphoenol pyruvate} \xrightarrow[\text{PPi}]{\text{Pi, } CO_2} \text{Oxaloacetate}$$



كما يتميز عدد كبير من الاحياء المجهرية بوجود مسارات لتخمر البنتوزات تحفزها انزيمات تكون معظمها من النوع المستحث inducible ٠ وتتبع مثل هذه الاحياء المجهرية الى مجموعة **E. Coli** وأجناس **Acetobacter** و **Clostridium** و **Micrococcus** ، حيث تستطيع بعد فترة حث induction مناسبة أن تخمر جميع D - الدوبنتوزات الاربعة (D - رايبوز ، D - أرابينوز D -زايلوز ، و D - لايكسوز) اضافة الى L - أرابينوز و L - زايلوز ٠

والمعادلة العامة التي تعبر عن هذه المسارات هي كالاتي :-

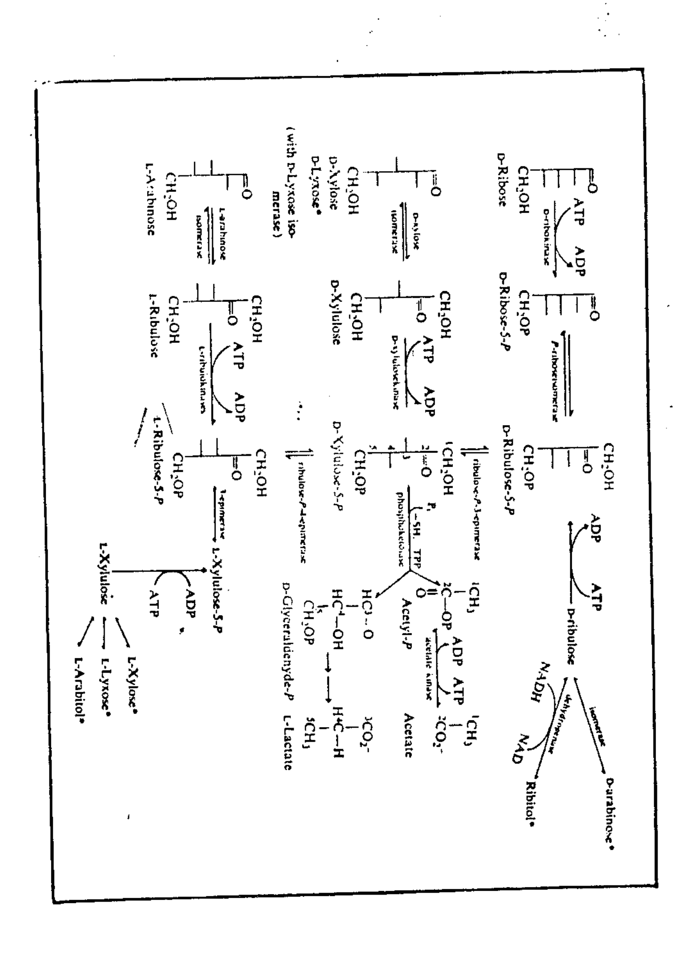
$$3\ \text{Pentose} + 5\ \text{Pi} + 5\ \text{ADP} \longrightarrow 5\ \text{Pyruvate} + 5\ \text{ATP} + 5\ H_2O + 10\ [H]$$

ومن الاحياء المجهرية ذات الاهمية الصناعية التي يلاحظ فيها القدرة على تخمير البنتوزات بعض أنواع البكتريا التابعة للجنس **Lactobacillus** حيث تكون معظم انزيمات المسار من النوع المستحث أيضا ٠ ويمكن التعبير عن المعادلة العامة لهذا المسار كما يلي :-

$$\text{Pentose} + 2\ \text{ADP} + 2\ \text{Pi} \longrightarrow \text{Acetate} + \text{L-Lactate} + 2\ \text{ATP}$$

ويوضح الشكل (5.4) تفاعلات المسار والانزيمات التي تنشط هذه التفاعلات أما المركبات المعلمة بنجوم ✱ فانها تمثل مواد التفاعل التي تستطيع البكتريا التابعة للجنس **Acetobacter** من استغلالها في حين لا تتمكن البكتريا التابعة للجنس **Lactobacillus** من تخميرها ٠

ويلاحظ في هذا المسار عدم وجود انزيمات ألدوليز وترايوز فوسفات ايسوميرز ، ويعود ذلك الى عدم امتلاك الاحياء المجهرية التي يوجد بها المسار لهذه الانزيمات ٠ كما يمكن ملاحظة دور D - زايليولوز-5 - فوسفات الذي يعد مركبا مركزيا في المسار ، وكذلك انزيم فوسفوكيتوليز الذي يقوم بدور مماثل لدور الالدوليز ٠



الشكل **(5.4)** تخمرات البنتوزات فى اللاكتوباسيلاي **Lactobacilli**

الفصل الخامس

الأكسدة الهوائية للكربوهيدرات

Aerobic Oxidation of Carbohydrates

1. مقـــدمة
2. خطوات دورة حامض الستريك
3. أهمية دورة حامض الستريك في التخليق الحيوي
4. العوامل المؤثرة في فعالية دورة حامض الستريك
5. دورة الجلايوكسيلات



1 . مقدمة

لقد عرف هذا المسار بعدة تسميات منها دورة حامض الستريك Citric Acid Cycle ودورة حـامض ثلاثـي الكـربوكسيل Tricarboxylic Acid Cycle ودورة كربس Krebs Cycle ٠ وجميع هذه التسميات ترتبط باسـم الكيمياوي الالماني المولد البريطاني الجنسية السير هانس كربس Hans Krebs الذي كانت له اسهامات بارزة في اكتشاف المسار ٠ ويعد المسار بمثابة مسار الايض الهدمي التأكسدي المشترك لجميع جزيئات « الوقـود » العضوية (كربوهيدرات ، وأحماض دهنية ، وأحماض امينية) في الاحياء الهوائية ٠ ويمكن اعتبار المسار الخطوة الاولى في عملية التنفس حيث يتم خلالها انتقال الالكترونات من جزيئات « الوقود » العضوية الى الاوكسجين الجزيئي ٠ وتعد عملية التنفس بحد ذاتهـــا أكثر تعقيدا وكفاءة من التحلل الجلايكولي ، اذ يعتقد بأن تطور وظهور هذا المسار الايضي لم يحدث الا بعد تطور ونشوء عملية التخليق الضوئي في النباتات الخضراء التي اسهمت في زيادة محتوى الغلاف الجوي من الاوكسجين لدرجة تكفي لعملية التنفس ٠ أما من ناحية الكفاءة فان التحلل الجلايكولي يقوم بتحرير جزء صغير فقط من الطاقة الكيمياوية الموجودة في تركيب جزيئة الجلوكوز ، في حين يتحرر مقدار كبير جدا من الطاقة عند اكسدة جزيئة الجلوكوز بصورة تامة الى ماء وثاني أوكسيد الكربون كما هو واضح من مقارنة تغير الطاقة الحرة القياسي المرافـق لتحويل الجلوكوز الى لاكتات مع التغير المرافـق لاكسدته الى مـاء وثاني أوكسيد الكربون :

$$\text{Glucose} \longrightarrow 2\ \text{Lactate} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -47.0\ \text{K cal.}$$

$$\text{Glucose} + 6\ O_2 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -686.0\ \text{K cal.}$$

وعندما يتخمر الجلوكوز لا هوائيا تغادر النواتج التي لا يمكن الاستفادة منهـــا بدرجة أكبر الخلية وهي لا تزال تحتوي على معظم طاقة جزيئة الجلوكوز الاصلية ، سيما أن نواتج التحلل الجلايكولي (كحامض اللاكتيك مثلا) على درجة من التعقيد مقارنة بجزيئة الجلوكوز ، فهي لا تزال في نفس الحالة التأكسدية وتحمـــل (كمعدل) نفس عدد ذرات الهيدروجين لكل ذرة كربون ٠ وعلى النقيض من ذلك ، فان نواتج التنفس مثل CO_2 تكون أبسط وأصغر بكثير من الجلوكوز كما تكون ذرات الكربون مؤكسدة بصورة تامة ٠ فضلا عن ذلك فان مقدار الطاقـــة

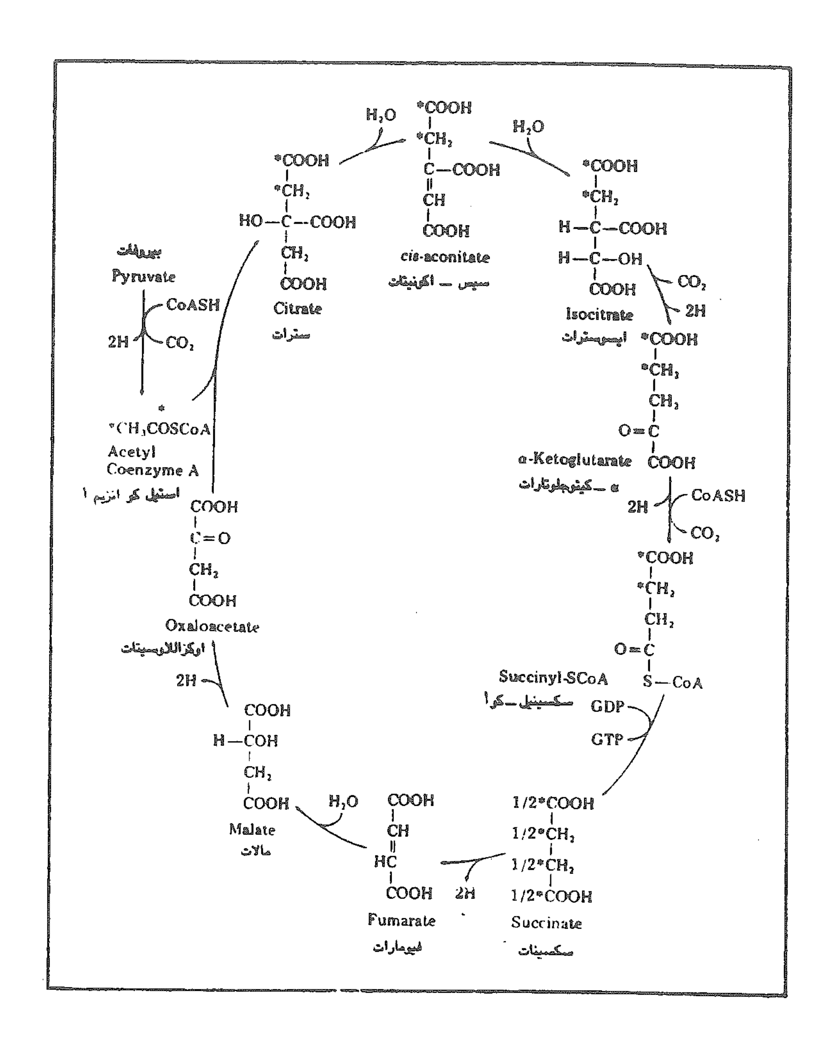
المتاحة عند انتقال زوج من الالكترونات من جزئية « وقود » معينـة الى مستقبل acceptor كالاوكسجين (كما في التنفس) تكون اكبر بكثيـر من الطاقـة الناتجة عن انتقال الالكترونات الى البيروفات (كما في التحلل الجلايكولي) · لذا فان الخلايا التي تنمو لا هوائيا تستهلك جلوكوزا آكثر من الخلايا التي تنمـو هوائيا للحصول على نفس المقدار من الطاقة ·

2 خطوات دورة حامض الستريك

بالرغم من الدور الاساس لحامض البيروفيك في التفاعلات الايضية ، اذ انه ينتج عن مسار التحلل الجلايكولي ويعد بمثابة حلقة وصل بين هذا المسار ودورة حامض الستريك ، الا أن هذا الحامض ليس من المركبات الوسطية في دورة حامض الستريك كما هو مبين في الشكل (1.5) · ويعد تفاعل تخليق السترات ، الذي يتم خلاله نقل مجموعة أستيل الإوكزالوأسيتات ، التفاعل الاول في دورة حامض الستريك · ويلاحظ من الدورة ان مجموعة الاستيل تنتج عن تفاعل من نـوع ازالة الكربوكسيل التاكسدية α-Oxidative decarboxylation الذي تزال خلالـه ذرة كربون بصـورة CO_2 · ويشترك في هـذا التفاعـل سـتة معاونات cofactors ويحفزه انزيم بيروفات ديهيدروجينيز · وفي الحقيقة أن الانـزيم الاخير ما هو الا معقد انزيمي يشترك في تركيبه ثلاثة أنواع من الانزيمات موزعة كالاتي :ـ

Lipoyl reductase-transacetylase	8 جزيئات
Pyruvate decarboxylase	24 جزيئة
Dihydrolipoyl dehydrogenase	24 جزيئة

ويلاحظ خلال هذه الدورة اكسدة ذرتي كربون الى CO_2 ، أي خلال كل لفة من لفات الدورة تتأكسد جزيئة (بصورة أستيل) · ومن الممكن تمييز أربعة تفاعلات من تفاعلات الاكسدة والاختزال Oxidation-reduction ، اذ يعد التفاعل الاول من هذا النوع وهو تفاعل تحويل أيسوسترات الى α -كيتوجلوتارات · أما التفاعل الثاني فهو تحويل α-كيتوجلوتارات الى سكسينيل-كوأ · ويعد تحويل السكسينات الى فيومارات التفاعل الثالث · أما التفاعل الرابع والاخير من هذا النـوع فهـو اكسدة المالات الى اوكزالواستيات · ويتم خلال هذه الدورة تكوين مركب فوسفاتي



الشكل (1.5) دورة حامض ثلاثي الكربوكسيل (دورة حامض الستريك)

غني بالطاقة (GTP) ينتج على حساب كسر رابطة ثايوأستر من جزيئة سكسينيل-كوأ · والتفاعل العام لهذه الدورة هو كالاتي :-

$$CH_3-\overset{\overset{O}{||}}{C}-COOH+2\tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow 3CO_2+2HO_2$$

ويلاحظ ادخال حامض البيروفيك الى المعادلة وذلك تحقيقا للربط بين مسار التحلل الجلايكولي للجلوكوز ودورة حامض الستريك · كما يظهر بأن خمسا من المركبات الداخلة في الدورة (وهي سكسينيل-كوأ ، وسكسينات ، وفيومارات ، و L - مالات ، واوكزالواستيات) يدخل في تركيبها أربع ذرات كربون فقط · ويستدل من موقع هذه المركبات في الدورة أن سلسلة التفاعلات التي تعقب اكسدة وازالة ذرة الكربون الثانية في الدورة (بهيئة CO_2) ، تستهدف اعادة تكوين الاوكزالواستيات لكي تستمر الدورة في أداء وظيفتها التأكسدية ·

اهمية دورة حامض الستريك في التخليق الحيوي

ذكرنا في الفصل الاول من هذا الباب بأن دورة حامض الستريك تعد من مسارات الايض المزدوج Amphibolic · ويعود ذلك الى دورها في الايض الهدمي من جهة ولتفرع عدد كبير من مسارات التخليق الحيوي عنها من جهة أخرى · ويأتي هذا التفرع كنتيجة لكون عدد من المركبات الوسطية في الدورة مركبات أولية أو مولدة precursors للعديد من المركبات البيولوجية · اذ تستطيع بعض الاحياء المجهرية عند اضطرارها للنمو على الكحول الاثيلي أو الخلات كمصدر وحيد للكربون ان تستعمل مثل هذه المركبات ثنائية الكربون في تخليق الكربوهيدرات وذلك بعد تحويلها الى استيل-كوأ الذي يعد احد المركبات الاساس في دورة حامض الستريك · وكما لاحظنا ان هذا المركب ينتج عن ازالة الكربوكسيل التأكسدية لحامض البيروفيك · والمركب أستيل-كوأ هو وحدة التخليق الاساس في عملية التخليق الحيوي للاحماض الدهنية · وبما ان استيل-كوأ وغيره من المركبات الوسطية لدورة حامض الستريك ينتج اما في المايتوكوندريا أو في غشاء البلازما (تبعا لنوع الكائن) فانه من الضروري انتقاله الى السايتوبلازم حيث توجد الانظمة الانزيمية المختصة بتخليق الاحماض الدهنية · ومن المعروف أن عملية انتقال أستيل-كوأ الى السايتوبلازم تتطلب تحويله أولا الى سترات وذلك بالاندماج مع

الاوكزالواسيتيات حيث تخرج بعد ذلك السترات الى السايتوبلازم وهناك يتم تكسيرها الى استيل-كوأ واوكزالواسيتيات بواسطة انزيم سترات لايز ٠

اضافة الى ذلك فان الاحياء المجهرية تستغل بعض المركبات الوسطية في الدورة في تخليق الاحماض الامينية وذلك لكون هذه المركبات الوسطية تشكل الهيكل الكربوني للاحماض الامينية : جلوتاميك ، وجلوتامين ، واورنثين ، وبرولين ، وهيدروكسي برولين ٠ في حين تمد الاوكزالوأسيتات الهيكل الكربوني لحامض الاسبارتيك والاسباراجين ٠ وعندما تكون الخلية في حاجة كبيرة لمثل هذه المركبات فانها تقوم بتخليقها بواسطة تفاعلات تسمى بالتفاعلات المالئة Anaplerotic Reactions ، حيث تتكفل هذه التفاعلات بمنع حدوث استنزاف في رصيد الخلية من تلك المركبات ، أي أن هذه التفاعلات ليست من ضمن تفاعلات الدورة ٠

4. العوامل المؤثرة في فعالية دورة حامض الستريك

تتأثر الدورة بعدد من العوامل التي تسيطر عليها وتنظم فعاليتها ، ومن اهمها :

(1) تكون تراكيز الانزيمات المحفزة لتفاعلات الدورة ثابتة نسبيا وذلك بالسيطرة الوراثية على التخليق الحيوي لهذه الانزيمات ٠ ويلاحظ في بكتريا Bacillus subtilis و B. cereus ان تخليق بعض انزيمات الدورة يتأثر بتراكيز المواد الايضية المختلفة اضافة الى السيطرة الوراثية ٠

(2) ومن العوامل المؤثرة والمسيطرة على أية سلسلة من التفاعلات هو مدى تيسر مواد التفاعل الاولية ٠ ومن البديهي أن يكون لتراكيز مواد التفاعل في تفاعلات الدورة تأثير منظم في فعاليتها ٠ اذ يلاحظ في بكتريا E. Coli ان نصف عمر Half-life هذه المواد لا يتجاوز اعشار الثانية باستثناء الاوكزالوأسيتات التي يكون نصف عمرها أقل من ذلك ٠ وقد لفتت هذه الملاحظة الانظار الى أهمية هذا المركب في الايض الوسطي ٠

(3) تحتاج دورة حامض الستريك الى امداد مستمر من جزيئات NAD^+ لكي تسير بصورة منتظمة ٠ كما أن هناك حاجة الى بقية الموافقات الانزيمية التي تدخل

في تفاعلات الدورة • لذا فان اختلال تراكيز المرافقات الانزيمية ينعكس بصورة واضحة على فعالية الدورة • وتقوم الخلية باعادة أكسدة NADH وتحويله الى NAD^+ عن طريق سلسلة نقل الالكترونات (الفصل السادس من هذا الباب) ، اذ أن لهذا المرافق الانزيمي دورا مهما في مختلف المسارات الايضية وخصوصا التاكسدية منها •

(4) وأخيرا ، فان السيطرة على الفعالية الانزيمية لبعض انزيمات الدورة تعد من وسائل التنظيم والسيطرة الموجودة في هذه الدورة • فالانزيم فيوماريز يثبط بواسطة ATP ، كما يعمل حامض اوكزالواسيتيك كمثبط تنافسي لانزيم سكسينات ديهيدروجينيز الا أن هذا التثبيط سرعان ما يزول عند اضافة ATP • ولهذا الاسلوب من السيطرة على فعالية الانزيمات فائدة كبرى للخلية ، فهو يمنحها القدرة على توجيه العمليات الايضية (البنائية والهدمية) والربط بينها بدرجة كبيرة من المرونة •

5. دورة الجلايوكسيلات Glyoxylate Cycle

عندما تضطر الاحياء المجهرية مثل **E. Coli** و **Pseudomonas** والطحالب الى استعمال الخلات كمصدر للطاقة وللمركبات الوسطية المختلفة الضرورية لتخليق الهياكل الكربونية لمكونات الخلية ، فانها تقوم باحداث تحوير في دورة حامض الستريك • وقد اصطلح على تسمية هذا التحوير بدورة الجلايوكسيلات Glyoxylate cycle • ويكون هذا التحوير بصورة تجاوز تفاعلات دورة حامض الستريك التالية وايجاد مسار بديل (الشكل 1.5) :

Isocitric acid ⟶ α-**Ketoglutaric acid** ⟶ Succinyl-CoA

L-Malic acid ⟵ **Fumaric acid** ⟵ Succinic **acid**

ويلاحظ من ذلك أن التحوير قد تسبب في حذف التفاعلين اللذين ينتج منهما ثاني أوكسيد الكربون • أما التجاوز فقد تم بواسطة تفاعلين يتضمن اولهما تكسير الايسوسترات الى سكسينات وجلايوكسيلات في حين يتم في الثاني تفاعل الجلايوكسيلات مع جزيئة أستيل-كوا لتكوين المالات :

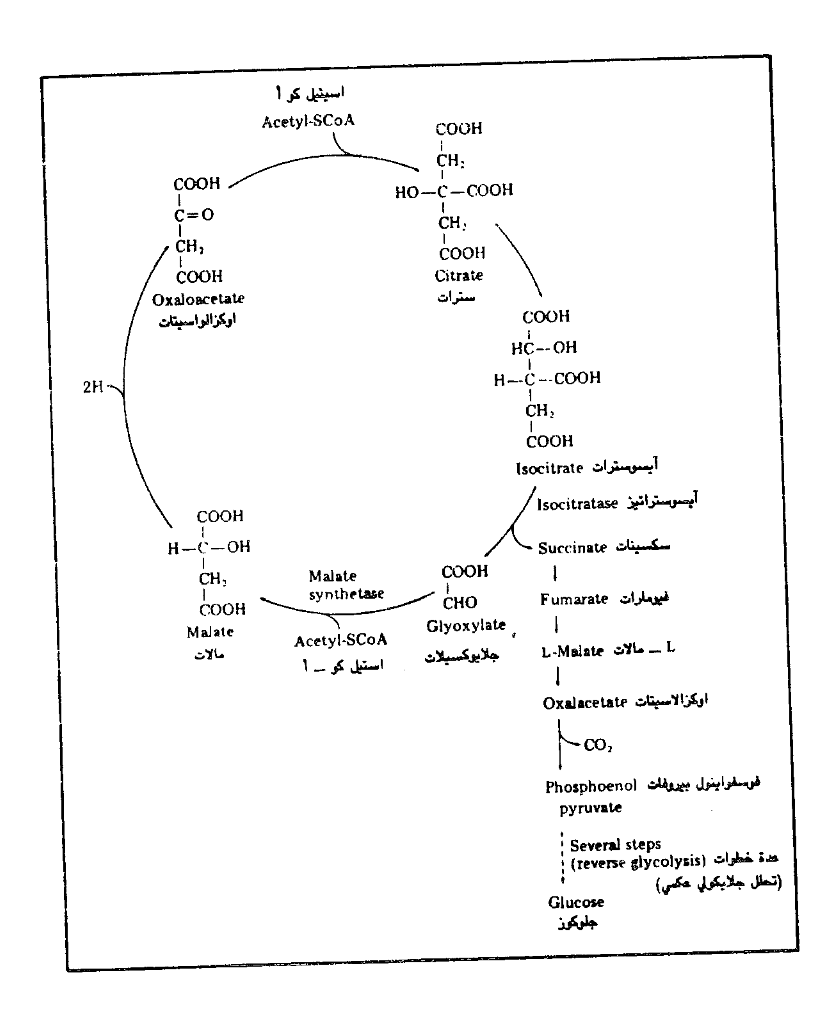
$$\begin{array}{l} H_2C-COOH \\ | \\ HC-COOH \\ | \\ HOC-COOH \\ \;\;H \end{array} \xrightarrow{\text{ايسوسترات لاييز}} \begin{array}{l} CH_2-COOH \\ | \\ CH_2-COOH \end{array} + \begin{array}{l} O=C-COOH \\ \;\;\;\;\;H \end{array}$$

ايسوسترات سكسينات جلايوكسيلات

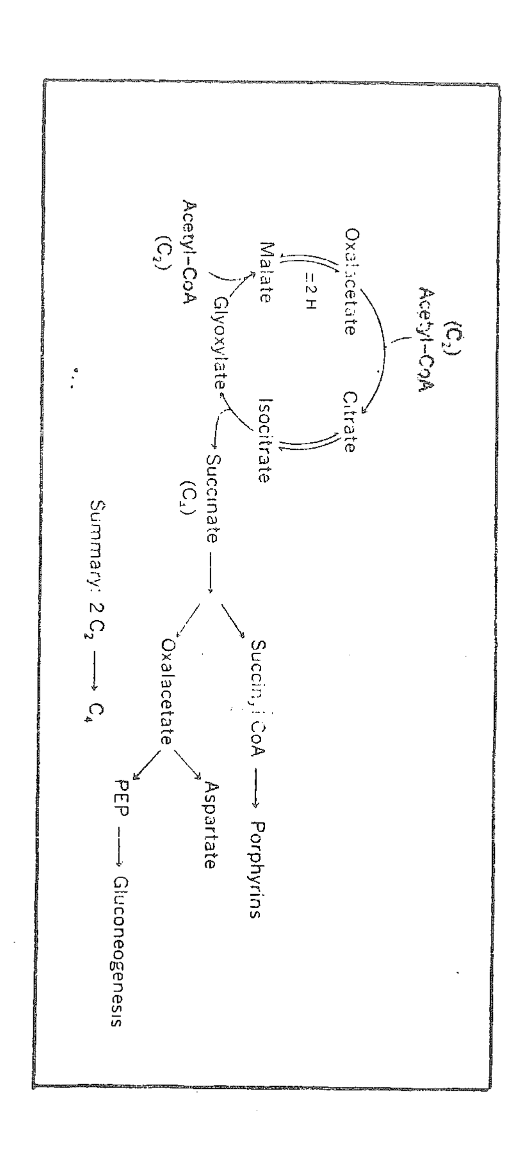
$$\begin{array}{l} O=C-COOH \\ \;\;\;\;\;H \end{array} + CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-S-CoA + H_2O \xrightarrow[\text{منشيز}]{\text{مالات}} \begin{array}{l} CH_2-COOH + Co \\ | \\ HOC-COOH \\ \;\;H \end{array}$$

جلايوكسيلات أستيل-كوأ L- مالات

والانزيمات الثلاثة الاخرى التي تقوم بتحفيز بقية تفاعلات الدورة فتشمل : ماليك دبهيدروجينيز ، وسترات سنثتيز ، واكونتيز · اذ تؤلف الانزيمات الخمسة دورة الجلايوكسيلات التي بواسطتها تحقق الخلية تحويل مولين من الاسيتات (بصورة أستيل-كوأ) الى حامض السكسينيك كما هو موضح في الشكلين (2.5) و (3.5) . وكذلك يتضح من الشكل (3.5) الدور البنائي الذي تضطلع به السكسينات ، فهي يمكن ان تتحول الى سكسينيل-كوأ وهذا بدوره يدخل في تركيب البورفيرينات ، أو يمكن أن تتأكسد الى اوكزالوأسيتات بواسطة التفاعلات التي سبق ذكرها في دورة حامض الستريك · وتستغل الخلية الاوكزالوأسيتات في تخليق حامض الاسبارتيك الذي تشتق منه عدة مركبات أيضية مهمة كالبريميدينات · كذلك يمكن للخلية تحويل الاوكزالوأسيتات الى فوسفواينول بيروفات (PEP) الذي يمكن أن يدخل تفاعلات الجلوكونيوجينسز **Gluconeogenesis** التي تستطيع الخلية بواسطتها تخليق الكربوهيدرات (الجلوكوز والنشا) · وفضلا عن ذلك يمكن للاوكزالوأسيتات أن تندمج مع أستيل-كوأ لتكوين المركبات الوسطية في دورة حامض الستريك التي تكون موضع طلب في الايض البنائي ·



الشكل (2.5) دورة الجلايوكسيلات



الشكل (3.5) الدور البنائي لدورة الجلايوكسيلات

الفصل السادس

سلسلة نقل الالكترونات والفسفرة التأكسدية

Electron Transport Chain and Oxidative Phosphorylation

1. مقـــدمة
2. مكونات سلسلة نقل الالكترونات
3. فسفرة مستوى مادة التفاعل والفسفرة التأكسدية
4. حسابات الطاقة



1. مقدمة Introduction

عند متابعة الفصول السابقة يمكن ملاحظة اختزال عدد لا بأس به من المرافقات الانزيمية خلال تفاعلات المسارات الايضية المختلفة. ولعل من أبرز المرافقات الانزيمية التي تختزل هي NAD^+ الذي يتحول الى NADH وFAD الذي يتحول الى $FADH_2$ وتكون مقادير نيوكليوتيدات الفلافين والنيكوتينأميد في الخلية محدودة ، الامر الذي يستوجب اعادة اكسدتها لضمان استمرار امداد المسارات الايضية بما تحتاجه من المرافقات الانزيمية المتأكسدة التي تعد عوامل مؤكسدة مباشرة في تفاعلات تلك المسارات . وتتم اعادة الاكسدة بواسطة انزيمات متخصصة موجودة في الغشاء الداخلي للمايتوكوندريا الذي يجاور المادة النسيجية matrix في الخلايا اليوكاريوتية Eucaryotes كالفطريات والطحالب والنباتات والحيوانات . أما في الخلايا البروكاريوتية Procaryotes كخلايا البكتريا بنوعيها الموجبة والسالبة لصبغة الجرام فان هذه الانزيمات توجد في غشاء البلازما وذلك لافتقار خلايا هذه الاحياء الى المايتوكوندريا . ونظرا لكون الاوكسجين الجزيئي هو العامل المؤكسد النهائي في الكائنات الحية الهوائية فان انتقال الالكترونات يسري من المرافق الانزيمي المختزل عبر سلسلة نقل الالكترونات وانتهاء بالاوكسجين كمستقبل نهائي لتلك الالكترونات . وعلى سبيل المثال يكون التفاعل العام لاعادة اكسدة NADH كالاتي :-

$$NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD + H_2O \qquad \Delta G' = -52.5 \text{ K cal}$$

ان مجموعة الانزيمات التي تحفز عملية الاكسدة هذه تؤلف ما نطلق عليه سلسلة نقل الالكترونات أو نظام نقل الالكترونات Electron transport system ، اذ يتم فيها أكسدة واختزال سلسلة متعاقبة من ناقلات الالكترونات بصورة متبادلة . كما يلاحظ من المعادلة السابقة ان اكسدة NADH بواسطة الاوكسجين الجزيئي يصاحبها انخفاض كبير في الطاقة الحرة يكفي لانتاج عدة مولات من ATP لكل مول NADH يعاد اكسدته . وتوجد الانزيمات التي تحفز انتاج ATP عند اكسدة NADH في نفس موضع سلسلة نقل الالكترونات (أي في الغشاء الداخلي للمايتوكوندريا أو غشاء البلازما تبعا لنوع الكائن) ، مما يضمن للخلية استغلال الطاقة المتحررة عن اعادة الاكسدة . ويطلق على عملية

استغلال الطاقة الناتجة من اكسدة NADH في انتــاج ATP الفسفرة التأكسدية Oxidative Phosphorylation أو كما تسمى بتعبير أدق فسفرة السلسلة التنفسية Respiratory Chain Phosphorylation • وبصورة عـــامة يمكن القول بأن الالكترونات التي فقدتها مركبات « الوقود » العضــوية خــلال مسارات الايض الهدمي تنتقل الى المرافقات الانزيمية وهذه تفقدها عند اعـــادة اكسدتها ليستقبلها الاوكسجين الجزيئي ، وبهذا تحقق الخلية هدفين أساسيين ، أولهما تجديد الصورة المتأكسدة للمرافقات الانزيمية وثانيهما استغلال الطاقـــة الناتجة في تكوين أواصر فوسفاتية غنية بالطاقة •

12. مكونات سلسلة نقل الالكترونات

Composition of the Electron Transport Chain

يشارك في نقل الالكترونات خمسة أنواع مختلفة من ناقلات الالكترونات ، تضم ثلاثة أنــواع من انزيمــات الاكسدة-الاختزال وبروتينات الحـديد اللاهيمي (NHI) Nonheme Iron Proteins والكينــونات Quinones • وتشـــمل انزيمـــــات الاكســدة-الاختــزال : الديهيدروجينيزات المرتبطـــة بالبيريدين ، والديهيدروجينيزات المرتبطة بالفلافين ، والسايتوكرومات • وفيما يلي وصـــف ملخص لاهم مميزات وخصائص كل من هذه الناقلات حسب تسلسلها في سلسلة نقل الالكترونات •

1.2. الديهيدروجينيزات المرتبطة بالبيريدين Pyridine-Linked Dehydrogenases

وسميت هذه المجموعة من الانزيمات بهذه التسمية وذلك لكونها تحتاج اما الى NAD أو NADP اللذين يحتويان في تركيبهما على النيكوتين أميد الذي هو مشتق من البيريدين • ويحفز هذا النوع من الديهيدروجينيزات التفاعل العام الاتي :-

$$\text{Reduced substrate} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Oxidized substrate} + NADH + H^+$$

$$\text{Reduced substrate} + NADP^+ \rightleftharpoons \text{Oxidized substrate} + NADPH + H^+$$

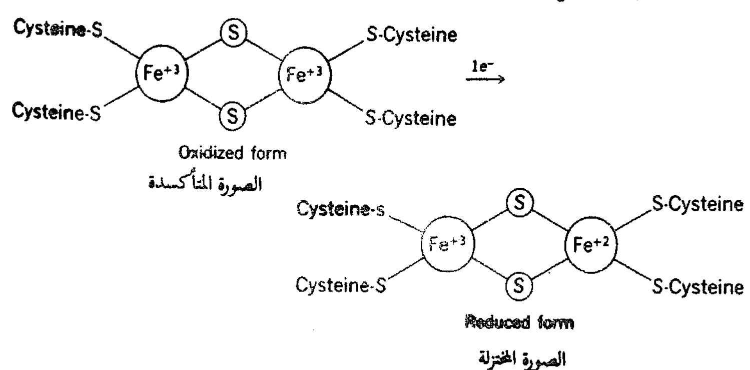
ويتضح من هذين التفاعلين أن هــذا النــوع من الانزيمات ينقــل مكافئي اختزال بصورة متعاكسة من مادة التفاعل الى الصورة المتأكسدة من نيوكليوتيد البيريدين • اذ يظهر أحد المكافئين في نيوكليوتيد البيريدين المختزل كذرة هيدروجين في حين يظهر الاخر بصورة الكترون • أما ذرة الهيدروجين الاخرى المنزوعة من مـــادة

التفاعل فانها تظهر في وسط التفاعل بصورة بروتون حر (H^+) ومن الملاحظ أنه بالرغم من أحتواء جميع خلايا الكائنات الحية على NAD و NADP الا انه عادة ما تكون نسبة NAD هي الاعلى ٠ فضلا عن ذلك فان هناك نوعا من التخصص في توزيع هذين المرافقين الانزيميين بين أجزاء الخلية ، ففي حين يكون القسط الاعظم من NAD موجودا في المايتوكوندريا ، فان الجزء الذائب من السايتوبلازم يحتوي على مقدار من NADP اكبر نسبيا من NAD ٠ ومما تقدم ، يمكن ان نخلص الى ان الديهيدروجينيزات المرتبطة بـ NAD تعمل بالدرجة الاساس في تفاعلات التنفس وتساهم في نقل الالكترونات من مواد التفاعل باتجاه العامل المؤكسد النهائي ، أي الاوكسجين ٠ وبالمقابل فان الديهيدروجينيزات المرتبطة بـ NADP تعمل بالدرجة الاساس في نقل الالكترونات الناتجة عن الايض الهدمي لمواد التفاعل الى تفاعل الايض البنائي الاختزالية (كتفاعلات تخليق الاحماض الدهنية) ٠ وبالرغم من وجود نوع من التخصص لهذه الديهيدروجينيزات اتجاه NAD أو NADP ، الا أن هناك بعض الاستثناءات ٠ اذ يمكن لبعضها أن يستخدم كلا المرافقين كما هو الحال مع انزيم جلوتامات ديهيدروجينيز ٠

2.2 الديهيدروجينيزات المرتبطة بالفلافين Flavin-Linked Dehydrogenases

يشمل هذا النوع من الانزيمات الديهيدروجينيزات التي تحتوي على فلافين أدنين ثنائي النيوكليوتيد FAD أو فلافين احادي النيوكليوتيد (FMN) كمجموعة مرتبطة ٠ ويطلق أيضا على هذه الانزيمات اسم فلافوبروتينات Flavoproteins ومن أهم الانزيمات المعروفة ضمن هذا النوع NADH - ديهيدروجينيز الذي يحفز انتقال الالكترونات من NADH الى بروتين من نوع بروتينات الحديد اللاهيمي في السلسلة التنفسية ٠ كذلك فان ارتباط FAD و FMN بالبروتين يكون محكما مقارنة بالـ NAD و NADP ٠ كما أن بعض هذه الانزيمات تحتوي على أكثر من جزيئة FAD أو FMN ٠ وعادة يعبر عن تفاعل اكسدة مادة التفاعل بانتقال ذرتي هيدروجين منها الى FAD أو FMN لينتج عن ذلك الصيغ المختزلة للفلافين وهي $FADH_2$ أو $FMNH_2$ ٠

- يرتبط هذا النوع من ناقلات الالكترونات بانزيم NADH ـديهيدروجينيز ٠ وقد سميت بهذه التسمية وذلك لكون الحديد الداخل في تركيبها موجودا بصورة مغايرة لمجاميع الهيم ٠ ويتراوح عدد ذرات الحديد في كل جزيئة بروتين بين ذرتين الى ثمان ذرات ٠ كما انها تحتوي على عدد مكافيء من السستايين التي يرتبط بها الحديد بالصورة التالية :



Oxidized form
الصورة المتأكسدة

Reduced form
الصورة المختزلة

ومن الملاحظ أن معاملة هذه البروتينات بالحامض ينتج عنها H_2S مما يدل على احتوائها على كبريت قلق تجاه الحامض ٠ كما أن هذه البروتينات تساهم في التخليق الضوئي وتثبيت النتروجين ، ومن اشهرها الفريدوكسين **Ferredoxin**

اضافة الى هذا النوع من البروتينات ، فان بعض البكتريا مثل **Clostridium pasteurianum** و **Micrococcus aerogenes** تحتوي على بروتين يحتوي على الحديد أيضا الا أنه لا يحتوي على الكبريت القلق تجاه الحامض ، ويسمى هذا البروتين روبريدوكسين **Rubredoxin** الذي يكون بمقدوره التعويض عن الفريدوكسين ٠ وعند تنمية خلايا بكتريا **Clostridium pasteurianum** على أوساط تفتقر الى الحديد ، يلاحظ ظهور ناقل جديد هو فلافودوكسين **Flavodoxin** وهذا الناقل عبارة عن فلافوبروتين ٠ وبامكان هذا البروتين أن يحل محل الفريدوكسين والروبريدوكسين في جميع فعاليتهما الايضية كتحرير الهيدروجين وتثبيت النتروجين واكسدة البيروفات ٠ ويحتوي هذا الناقل على **FMN** كمجموعة مرتبطة عوضا عن الحديد كما أنه يخلو من الكبريت القلق ٠

4.2 الكينونات Quinons

يعمل هذا النوع من ناقلات الالكترونات على انتقال الالكترونات بين الفلافوبروتينات والسايتوكرومات ۰ وهذه الكينونات هي من نوع بنزوكينونات Benzoquinones ومن أشهرها يوبيكينون Ubiquinone الذي له التركيب العام التالي :

$$\text{Ubiquinone: } 2,3\text{-}(CH_3O)_2\text{-}5\text{-}CH_3\text{-}1,4\text{-benzoquinone-}6\text{-}(CH_2-CH=C(CH_3)-CH_2)_nH$$

Ubiquinone

ويختلف طول السلسلة الجانبية باختلاف نوع الخلية اذ يتراوح عدد وحدات الايسوبرينويد (n) بين ستة الى عشرة ، ويصطلح على تسمية هذا الكينون بالمرافق الانزيمي Q (Coenzyme Q) ويختصر بـ $Co\ Q_{10}$ في حالة كون $n=10$ ۰ في حين يكون عدد وحدات الايسوبرينويد في البكتريا مساويا الى 6 في الغالب ، وفي هذه الحالة يختصر بـ $Co\ Q_6$ ۰ الا ان بعض أنواع البكتريا مثل **Mycobacteria** تحتوي على نافثوكينونات **Naphthoquinones** كفيتامين K عوضا عن البنزوكينونات ۰ ويستطيع هذا الناقل أن ينقل الالكترونات في عدة فلافوبروتينات مثل NADH — ديهيدروجينيز ، وسكسينات ديهيدروجينيز ، وجليسرول فوسفات ديهيدروجينيز ، وفاتي أسيل-كوأ ديهيدروجينيز ۰

5.2 السايتوكرومات Cytochromes

تشمل السايتوكرومات مجموعة من البروتينات المحتوية على الحديد التي تقوم بنقل الالكترونات من Co Q الى الاوكسجين الجزيئي في الخلايا الهوائية ۰ وتمتلك هذه البروتينات المرتبطة **Conjugated proteins** مجاميع مرتبطة بصورة بورفيرينات الحديد **Iron porphyrins** ۰ ومن المعروف أن السايتوكرومات يمكن أن تختزل وتتأكسد بصورة متبادلة بفضل احتوائها على الحديد البورفيريني ۰ اذ يكون الحديد في السايتوكروم المتأكسد بصورة حديديك (Fe^{3+}) وعند اختزال السايتوكروم فان الحديديك يتحول الى حديدوز (Fe^{2+}) وذلك

لاستقبال المدار الخارجي valence shell لذرة الحديد لالكترون واحـــــد ٠ وبواسطة هذه الخاصية تتمكن السايتوكرومات من القيام بوظيفة نقل الالكترونات ٠ فعند اعادة اكسدة $CoQ-H_2$ (المختزل) تختزل السايتوكرومات ، وبالتحديد السايتوكروم الملاصق لـ CoQ، اذ أن هناك خمسة سايتوكرومات في الاقــل هي سايتوكروم b و c و c_1 و a و a_3 ٠ وتتطلــب الاكسدة تفاعـــل جزيئتي سايتوكروم مع جزيئة كينون مختزلة وذلك لان الاخيرة تقدم الكترونين لاختزال حديد السايتوكروم ، ويمكن توضيح ذلك بالتفاعل التالي :

$$CoQ-H_2 + 2cytochrome-(Fe^{3+}) \longrightarrow CoQ + 2\,Cytochrome-(Fe^{2+}) + 2H^+$$

ويطلق البروتونان الناتجان من التفاعل الى الوسط المحيط بالتفاعل ٠ وقد دأبت بعض المراجع ولعدة سنوات على تسمية الناقل الاخير في السلسلة باسم سايتوكروم أوكسيديز في حين انه يتكــون من سايتوكروم a . a_3 ويلقــب بالاوكسيديز الطرفي Terminal oxidase ٠ ومن المعروف ان لهــذا الناقــل القــدرة على اختزال الاوكسجين الجزيئي الى ماء في تفاعل يحتاج الى أربعة الكترونات لـــكل مول من الاوكسجين يتم اختــزاله ، والتفاعــل بين الاوكسجين وسايتوكروم a_3 هو كالاتي :ـ

$$4cytochroma\ a_3-Fe^{2+} + O_2 + 4\,H^+ \longrightarrow 4\ cytochroma\ a_3-Fe^{3+} + 2\,H_2O$$

ويلاحظ وجــود اختلاف في مكــونات سلسلة نقل الالكترونات في بعض أنــواع البكتــريا اذ تتكــون السلسلة فــي **E. coli** من فلافوبروتينات وسايتوكرومات b_1, a_1, a_2, O أما في بكتريا **Azotobacter vinelandii** فانها تتكون من فلافوبروتينات وسايتوكرومات b_1 , c_4 , c_5 , a_1 , a_2 ٠

3. فسفرة مستوى مادة التفاعل والفسفرة التاكسدية

Substrate Level Phosphorylation and Oxidative Phosphorylation

تشمل تفاعلات الفسفرة التفاعلات الايضية التي يتــم فيها انتــاج مركبات الفوسفور ذات الطاقة العالية وذلك باستغلال تغير الطاقة الحرة الكبير (السالب) الذي يصاحب بعض التفاعلات الايضية وتحويل جزء منه الى أصرة فوسفاتية غنية بالطاقة كما في تحويل ADP الى ATP ٠ وهناك نوعان من تفاعلات الفسفرة هما فسفرة مستوى مادة التفاعل Substrate Level Phosphorylation

والفسفرة التأكسدية Oxidative Phosphorylation . لقد سبق أن لاحظنا بعض تفاعلات النوع الاول في الفصول السابقة ، ومن الامثلة على هذه التفاعلات الاتي :ـ

مسار التحلل الجلايكولي

$$\text{1,3—Diphosphoglyceric acid} \xrightarrow{ADP \ \ ATP} \text{3—Phosphoglyceric acid}$$

$$\text{Phosphoenolpyruvic acid} \xrightarrow{ADP \ \ ATP} \text{Pyruvic acid}$$

دورة حامض الستريك

$$\text{Succinyl—Co A} \xrightarrow{ADP \ \ ATP} \text{Succinic acid}$$

في حين تمتاز الفسفرة التأكسدية بكونها مرتبطة بسلسلة نقل الالكترونات أي أن مصدر الطاقة للفسفرة هو تفاعلات اعادة اكسدة المرافقات الانزيمية المختزلة ، اذ أن تغير الطاقة الحرة الذي يصاحب أكسدة مول واحد من NADH يكون كبيرا جدا كما في التفاعل التالي :

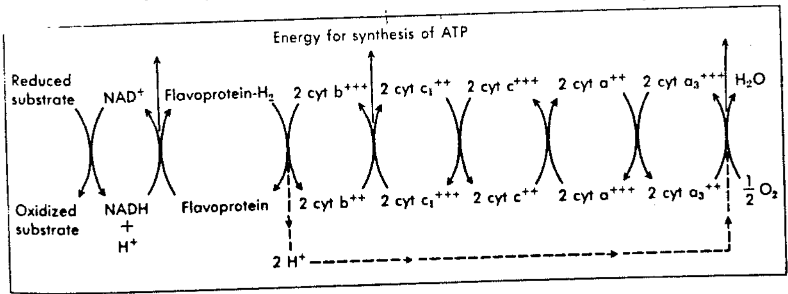
$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O \qquad \Delta G' = -52,600 \text{ cal.}$$

فاذا ما تذكرنا بأن تخليق كل مول من ATP يحتاج الى ما يقارب 7300 كالوري (سعرة) ، يصبح من السهل التكهن بامكانية انتاج أكثر من مول واحد من ATP باستغلال تغير الطاقة الحرة الكبير ذي القيمة السالبة والمصاحب لاكسدة مول واحد من NADH . وتتجلى هذه الحقيقة في التفاعل العام لاكسدة NADH الذي يشمل تفاعلات الفسفرة المصاحبة للاكسدة :

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 + 3\ ADP + 3\ H_3PO_4 \longrightarrow NAD^+ + 3\ ATP + 4\ H_2O$$

يلاحظ من هذا التفاعل ان كل ذرة اوكسجين يتم استهلاكها يقابلها ارتباط ثلاث ذرات فوسفور بروابط أسترية ، ولهذه النسبة أهمية عظمى في معرفة كفاءة عملية التنفس الخلوي اذ تكون النسبة في الحالات الطبيعية كما هي موضحة في التفاعل السابق 3 . أي أن نسبة P : O هي 3 . وتعبر هذه النسبة عن نسبة عدد ذرات الفوسفور المؤسترة الى عدد ذرات الاوكسجين المستهلكة. أما انتاج هذا

المقدار من ATP فانه لا يتم دفعة واحدة وانما على مراحل وعند خطوات معينة من خطوات سلسلة نقل الالكترونات كما هو مبين في الشكل (1.6) ٠



الشكل (1.6) سلسلة نقل الالكترونات

وكذلك يوضح الشكل (1.6) خطوات السلسلة التي تتم عندها تفاعلات الاسترة أي تكوين ATP ، اذ تنتج الجزيئة الاولى بعد اعادة اكسدة NADH، والثانية بعد اعادة اكسدة سايتوكروم b ، والثالثة بعد اعادة اكسدة سايتوكروم c ٠ ولا يعد هذا التوزيع لخطوات الفسفرة عشوائيا وانما يعتمد على قيم جهد الاختزال (E_0') لاعضاء سلسلة نقل الالكترونات ، اذ تكون هذه القيم كالاتي :ـ

$$\underset{(-0.32\ V)}{NADH} \xrightarrow{ATP} \underset{(-0.03\ V)}{f_p : NHI} \longrightarrow \underset{(0.1\ V)}{Co\ Q} \longrightarrow \underset{(0.04\ V)}{Cyt.\ b}$$

$$\downarrow ATP$$

$$\underset{(0.8\ V)}{O_2} \xleftarrow{ATP} \underset{(0.29\ V)}{cyt.\ a + a_3} \longleftarrow \underset{(0.25\ V)}{cyt.\ c} \longleftarrow cyt.\ c_1$$

ويلاحظ من هذا المخطط أن الفسفرة تكون مصاحبة للخطوات المتميزة بفرق كبير في جهد الاختزال (E_0') ، اذ يضمن فرق الجهد الكبير تغيرا كبيرا في الطاقة الحرة $\Delta G'$ يكفي لانتاج ATP وذلك نتيجة للعلاقة الطردية بين $\Delta G'$ وفرق جهد الاختزال ($\Delta E_0'$) :

$$\Delta G' = -n F \Delta E_0'$$

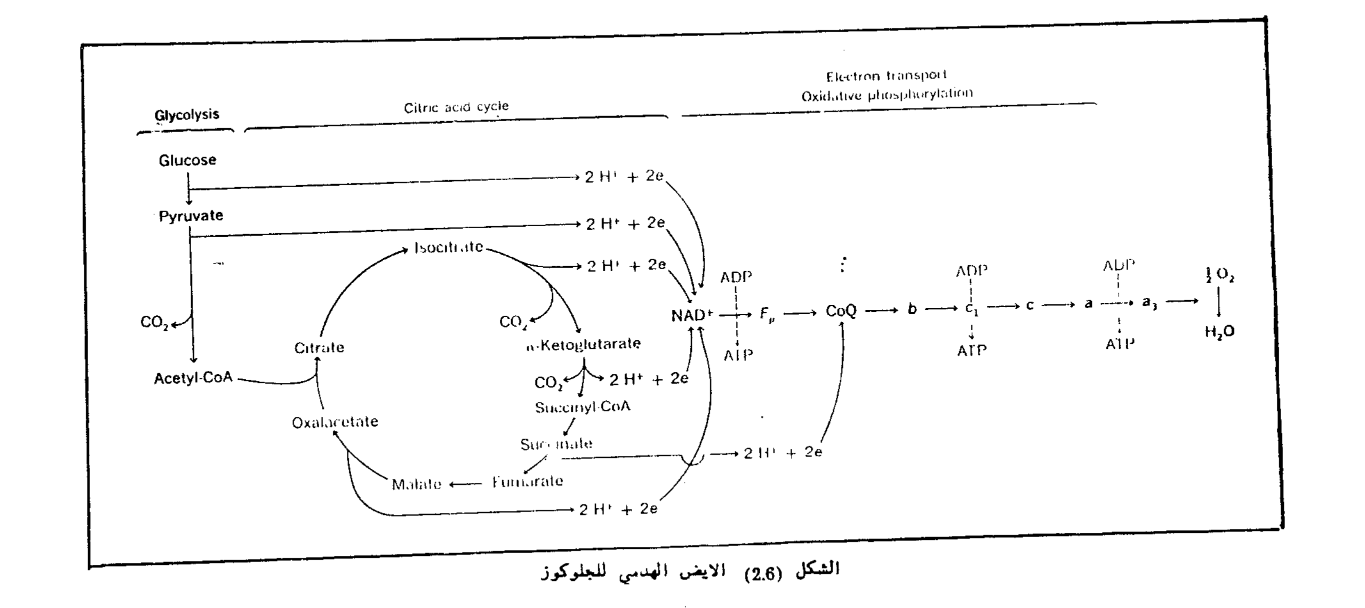
ويعد هذا الترافق أو الازدواج بين نقل الالكترونات والفسفرة ضروريا جدا لحياة الكائن الحي ، اذ أن الهدف الاساس للخلية من هذا النظام هو انتاج الطاقة الضرورية لفعالياتها الحيوية المختلفة ٠ ولبعض مركبات السيانيد والمضادات

الحيوية تأثير قاتل للخلية وذلك من خلال فصل هذا الازدواج بين نقل الالكترونات والفسفرة ، وعليه يطلق على مثل هذه المركبات عوامل فك الازدواج Uncoupling Agents • اذ ان وجود مثل هذه المركبات في الوسط المحيط بالخلية يجعل عملية نقل الالكترونات تسير بسرعة قد تكون أكبر من المعتاد ولكن بدون حدوث فسفرة ADP الى ATP ، مما يدفع الى الاعتقاد بأن الفسفرة تبدو كخطوة محددة للسرعة • ومن الامثلة على هذه المركبات 4,2 – ثنائي نيتروفينول ، وجراميسيدين ، وانتيمايسين ، وفالينومايسين • بينما تثبط بعض المضادات الحيوية مثل اوليجومايسين وروتامايسين كلا من نقل الالكترونات والفسفرة •

4. حسابات الطاقة

لو تتبعنا تفاعلات الايض الهدمي التي تتعرض لها جزيئة جلوكوز بدءا بتفاعلات مسار التحلل الجلايكولي ثم دورة حامض الستريك واخيرا سلسلة نقل الالكترونات لاستطعنا التعرف على مقدار الطاقة التي تحتجزها الخلية بصورة ATP والتي تنتج عند خطوات معينة في هذه المسارات • ويقدم الشكل (2.6) ملخصا اجماليا للتفاعلات المختلفة لهذه المسارات ، اذ يوضح الشكل المراحل أو الخطوات التي يتم خلالها اختزال المرافقات الانزيمية خلال مسار التحلل الجلايكولي ودورة حامض الستريك ثم اعادة اكسدة هذه المرافقات المختزلة خلال سلسلة نقل الالكترونات • وكذلك يجمع الشكل (2.6) بين فسفرة مستوى مادة التفاعل والفسفرة التاكسدية المصاحبة لاكسدة جزيئة الجلوكوز اكسدة تامة الى ماء وثاني أوكسيد الكربون •

وبالاستعانة بالمعلومات الواردة في الفصول السابقة والشكل (2.6) يمكن حساب العدد الكلي لجزيئات ATP الناتجة كالاتي :—



الشكل (2.6) الايض الهدمي للجلوكوز

التحلل 2 substrate level phosphorylations — 2 ATP = 2 ATP

الهلايكولي $2 \times [2H^{+} + 2é]$ NAD oxidative phosphorylation = 6 ATP

استيل كو-انزيم $2 \times [2H^{+} + 2é]$ NAD oxidative phosphorylation = 6 ATP

دورة $3 \times 2[2H^{+} + 2é]$ NAD oxidative phosphorylation = 18 ATP

حامض $2 \times 1[2H^{+} + 2é]$ FAD oxidative phosphorylation = 4 ATP

الستريك 2 substrate level phosphorylations = 2 ATP

38 ATP

ان أكسدة مول واحد من الجلوكوز اكسدة تامة بواسطة الاوكسجين الى ماء وثاني أوكسيد الكربون يحرر طاقة كبيرة كما هو مبين في المعادلة الاتية :ـ

$$C\,H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H\,O \quad \Delta G' = -686000 \text{ cal. } (pH = 7.0)$$

اما تغير الطاقة الحرة المصاحب لاكسدة الجلوكوز في الخلية الحية فانه يقل عن هذا المقدار وذلك لان جزءا من الطاقة المتحررة تحتجز بصورة ATP ، ويمكن حساب مقدار هذه الطاقة المتحجزة باستعمال قيمة 7300 كالوري كتعبير عن مقدار الطاقة اللازمة لتخليق ATP واحدة وذلك كما في المعادلة التالية :ـ

(38 ATP) (−7300 cal.) = −277000 cal. (الطاقة المتحجزة بصورة ATP)

اذن يمكن التعبير عن الاكسدة الخلوية للجلوكوز كما يلي :

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 + 38\ ADP + 38\ H_3PO_4 \longrightarrow 6\ CO_2 + 38\ ATP + 44\ H_2O$$

(−686000 cal. وذلك بعد طرح الطاقة المحتجزة من) $\Delta G' = -409{,}000$ ca

أما كفاءة حفظ الطاقة من قبل الخلية فانها :

$$\frac{277000}{686000} \times 100 = 40\ \%$$

وهذه القيمة تعني بأن الخلية قد استطاعت استخلاص 40% من الطاقة المتاحة في جزيئة الجلوكوز وحفظها بصورة مركبات ذات طاقة عالية تستغلها كلما دعت الحاجة الى استعمالها كتفاعلات الايض البنائي ٠

مراجـــع البـــاب الثـــالث

Allen, L.A. (1964) — The biochemistry of industrial micro-organisms. Chem. Ind. May 23, p. 877-880.

Aurand, L.W., and Woods, A.E. (1973) — Food chemistry. 1st ed. AVI Publishing Co., Inc., Westport, Conn.

Conn, E.E., and Stumpf, P.K. (1976) — Outlines of biochemistry, 4rth ed. John Wiley &. Sons. Inc., New York.

Goodwin, T.W. (1968) — The metabolic roles of citrate. Academic Press, New York.

Harold, F.M. (1972) — Conversion and transformation of energy by bacterial membranes. Bacteriol. Rev., 36, 172.

Kalckar, H.M. (1969) — Biological phosphorylations : development of concepts. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J.

Kelly, D.P. (1971) — Antotrophy : concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism. Ann. Rev. Microbiol., 25, 177-210.

Lehninger, A.L. (1964) — The mitrochondrion : molecular basis of structure and function. Benjamin, Inc. New York.

Lehninger, A.L. (1965) — Bioenergetics. Benjamin, Inc., New York.

Lehninger, A.L. (1975) — Biochemistry. Worth Publishers Inc., New York.

Lowenstein, J.M. (1967) — The tricarboxylic acid cycle. In "Metabolic pathways". (D.M. Greenberg. ed) 3rd ed. Vol. 1. Academic New York.

Mahler, H.R., and Cordes, E.H. (1971) — Biological chemistry, 2nd ed. Haper and Row, New York.

Moat, A.G. (1979) — Microbial physiology. John Wiley & Sons Inc., New York.

Newsholme, E.A., and Start. C. (1973) — Regulation in metabolism. John Wiley & Sons Inc., New York.

Payn . J.W. (1980) -- Microorganisms and nitrogen sources. John Wiley & Sons Inc., New York.

Rainbow, C., and Rose, A.H. (1963) --- Biochemistry of industrial microorganisms. Academic Press, New York.

.odes, A., and Fletcher, D.L. (1966) -- Principles of industrial microbiology, 1st ed. Pergamon Press. Oxford.

Roodyn, D.B. (1967) — Enzyme cytology. Academic Press, New York.

Rose, A.H. (1976) — Chemical microbiology: an introduction to microbial physiology. 3rd ed. Butterworths, London.

Stanier, R.Y., Adelberg, E.A., and Ingraham, J. (1976) -- The microbial world. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J.

PART 4

الباب الرابع

اتجاهات في الميكروبيولوجي الصناعي

TRENDS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY



الفصل الاول

المنتجات الاولية لايض الاحياء المجهرية

Primary Products of Microbial Metabolism

1. مقدمة
2. أهمية المواد الايضية الاولية
3. الاحماض الامينية
4. نيوكليوتيدات النكهة
5. الفيتامينات
6. الاحماض العضوية
7. التحولات الحيوية
8. المذيبات
9. بروتين الخلية الواحدة



يسهم الانتاج الميكروبي للمواد الايضية بدرجة كبيرة في توفير متطلبات الحياة • فالاحياء المجهرية النامية على مصادر كربون رخيصة يمكنها بواسطة التخمر انتاج منتجات نافعة وذات قيمة كالاحماض الامينية والنيوكليوتيدات والاحماض العضوية والفيتامينات التي قد تضاف الى الاغذية لتعزيز نكهتها أو لزيادة قيمتها الغذائية • ان اسهام الاحياء المجهرية يفضي بشكل جيد الى ما وراء صناعة الغذاء مع الاهتمام المتجدد بالتخمرات المنتجة للمذيبات •

وللاحياء المجهرية المقدرة على تجهيز العديد من المنتجات المشتقة من البترول فضلا عن الايثانول الضروري للوقود السائل • وبالتأكيد سوف تزداد أهمية دور المواد الايضية الاولية وكذلك الاحياء المجهرية المنتجة لها في المستقبل •

2- اهمية المواد الايضية الاولية Importance of Primary Metabolites

اعتمد التطور الكبير في الصناعة التخمرية على ثلاث سمات مهمة للاحياء المجهرية هي :-

1. النسبة العالية للمساحة السطحية الى الحجم التي سهلت الامتصاص السريع للمواد الغذائية اللازمة لتشجيع المعدلات العالية للايض والتخليق الحيوي •
2. الانواع الهائلة من التفاعلات التي تستطيع الاحياء المجهرية أجراءها •
3. السهولة في التكيف لظروف البيئة والتغيرات الحاصلة فيها التي تجيز نقل المزرعة من الطبيعة الى الدورق المختبري حيث تكون قادرة على النمو على مصادر كربونية ونتروجينية رخيصة لكي تنتج مركبات ثمينة •

ويمكن ادراك قدرة المزرعة الميكروبية في عالم التخليق التنافسي بحقيقة أنه حتى الجزيئات البسيطة مثل حامض L- جلوتاميك و L- لايسين لا تزال تنتج بواسطة التخمر وليس بواسطة التخليق الكيمياوي • وبالرغم من أن بعض مجالات التخمر الصناعي قد فقدت لصالح التخليق الكيمياوي (مثل الكحول الصناعي والمذيبات) الا انه من الواضح أن الغالبية لا زالت لصالح التخليق الميكروبي • وبالرغم من كفاءة التخليق الكيمياوي للرايبوفلافين ، الا أن انتاج هذا المركب لا يزال يجري بواسطة التخمر وأيضا بواسطة التخليق • وعلى وجه التقريب ،

لا تزال العمليات الكيميائية الكاملة لانتاج فيتامين C والستيرويدات تستخدم خطوات التحويل الحيوي الميكروبي ، كما تعد أغلب المنتجات الطبيعية معقدة جدا وتحتوي على العديد من مراكز التماثل التي قد يكون من المستحيل انتاجها تجاريا بواسطة التخليق الكيمياوي • ان مفتاح حفظ حياة الصناعة التخمرية هو مقدرتنا على التحوير الوراثي للمزارع الميكروبية الى حالات من الانتاجية العالية •

وقد استخدمت لسنوات عديدة المنتجات الميكروبية ذات الوزن الجزيئي المنخفض لتعزيز جودة وتيسر الغذاء • ويدرج الجدول (1.1) قائمة بالمنتجات التي استخدمت ولا تزال تستخدم في صناعات الغذاء والتغذية •

ان سبب هذا الاستخدام المؤثر للاحياء المجهرية هو بسيط : اذ تمتلك الاحياء المجهرية قدرة مذهلة في استعمال مصادر رخيصة من الكربون والنتروجين لتفرط في انتاج مواد ايضية نافعة ذات الوزن الجزيئي المنخفض والمرتفع • ان الافراط في الانتاج over production هو تجمع المادة الايضية داخل أو خارج الخلية الى المستوى (قائم على أساس الحجم الكلي لبيئة التخمر) الذي يزيد بقدر مرة واحدة في الاقل على مقدار التركيز الاعتيادي الذي تتطلبه الاحياء المجهرية الصعبة الارضاء fastidious من أجل نموها الامثل •

الجدول (1.1)

بعض المنتجات التخمرية المستخدمة في صناعة الغذاء والتغذية

الصنف	الأمثلة
الكحولات	الايثانول
الاحماض الامينية	حامض الجلوتاميك، لايسي، ثريونين
مضادات الاكسدة	حامض آيسواسكوربيك، حامض -5- جوانيليك
النيوكليوتيدات	حامض 5- إنيوسينيك
الاحماض العضوية	حامض الخليك، حامض البروبيونيك، حامض السكسينيك حامض الفيوماريك، حامض اللاكتيك، حامض الماليك، حامض التارتاريك، حامض الستريك، حامض الجلوكونيك
عديدات الآول (Polyols)	الجليسرول، المانيتول
البروتين	بروتين وحيد الخلية
السكريات	الفركتوز، السوربوز
الفيتامينات	الايبوفلافين (B_2)، سيانوكوبالامين (B_{12})

وتؤكد المعلومات الواردة في الجدول (2.1) القدرات الكبيرة لبعض الاحياء المجهرية المتميزة بفرط الانتاج .

الجدول (2.1)

الفرط في انتاج بعض المواد الايضية الأولية الميكروبية

المنتوج	متطلبات النمو (1) (ملغم/ لتر)	الانتاج (2) (ملغم/ لتر)	نسبة المنتج/ المطلوب
لايسين	250	50000	$^{2}10x2.0$
حامض الجلوتاميك	300	100000	$^{2}10x2.3$
حامض إينوسينيك	25	13000	$^{2}10x5.2$
رايبوفلافين	0.5	10000	$^{4}10x2.0$
سيانوكوبالامين	0.001	50	$^{4}10x5.0$

(1) عموما تستخدم هذه التراكيز لاعطاء النمو الامثل للعديد من الاحياء المجهرية ومن المحتمل ان تكون مفرطة نوعا ما ٠

(2) تمثل هذه التراكيز على وجه التقريب المقادير القصوى المذكورة في المراجع

وتقع العديد من الجزيئات الموضحة في الجدول السابق في فئة المواد الايضية الاولية ، وهي الجزيئات الصغيرة لجميع الخلايا الحية التي تعد نواتج وسطية او نهائية لمسارات الايض الوسطي ، او هي تلك المستخدمة كقوالب بنائية للجزيئات الكبيرة ، أو تتحول الى مرافقات انزيمية Coeuzymes ٠

ومن وجهة النظر الصناعية ، تعد الاحماض الامينية والنيوكليدتيدات والفيتأمينات والمذيبات العضوية اكثر اهمية ٠ ومن وجهة نظر الاحياء المجهرية ، فان الافراط في انتاج المواد الايضية الاولية يعد عملية مؤدية الى التلف والضياع وانها تحدث دائما بعد فترة فقط من كسر موجهات الانتظام التي نشأت في الانظمة الحية لمنع الافراط في التخليق ٠

ان المزارع المتغيرة التنظيم تكون اقل ملاءمة للتنافس في الطبيعة من اجل البقاء ازاء الاحياء الاخرى المالكة لميكانيكيات تنظيم اعتيادية ٠

ومن الطبيعي أن يعني المتخصصون بالميكروبيولوجي الصناعي بالافراط في التخليق ، وبالتالي عندما يجدون مزرعة متغيرة التنظيم قليلا في الطبيعة او في

مجموعة المزارع فانهم يبذلون جهودهم في تغيير تنظيم المزرعة الى مدى ابعد ٠

وبواسطة التحويرات الوراثية والبيئية من الممكن تغيير ميكانيكات التنظيم وبالتالي اجبار الاحياء المجهرية نحو الافراط في الانتاج وافراز المواد الايضيـة الاولية ذات الاهمية التجارية ٠

3. الأحماض الامينية Amino Acids

ان تجنب تنظيم التغذية الاسترجاعية يكون بتحديد قدرة الخلية على تكديس المثبطات ضمن الخلية والنواتج النهائية الكبحية ، وهذا يتم عادة بانتاج متطفـر غذائـي auxotrophic وتجويعه جـزئيا بالنسـبة لهـذا الاحتياج ٠ ويتحصل بمثل هذه الطريقة على مستويات عالية مـن الاحمـاض الامينيـة والنيوكليوتيدات ، ويقوم قتص L- لايسين التجاري على هذا الاساس ٠ ويوضح الجدول (3.1) انتاج المواد الايضية الاولية بطريقتين ٠

والوسيلة الثانية لتجنب تنظيم التغذية الاسترجاعية هي بانتـاج متطفرات مقاومة لمشابهات سامة للمادة الايضية المرغوبة وكما هو موضح في الجدول (3.1) ٠

الجدول (3.1)
انتاج المواد الايضية الاولية

أ) بواسطة التجويع الجزئي لمتطفرات غذائية :

الناتـج	الاحتياج الغذائي
حامض L-جلوتاميك	الجليسرول أو البيوتين
L- لايسين	هوموسيرين
L- ثريونين	لايسين ، ميثيونين ، أيسوليوسين

ب) بواسطة انتخاب متطفرات مقاومة لمضادات المادة الايضية :

الناتـج	المقاومة لمضاد المادة الايضية
L- ثريونين	حامض α - امينو - β - هيدروكسي فاليريك
L- ميثيونين	ايثيونين
L- تريبتوفان	5- فلوروتريبتوفان

ويبين الجدول (4.1) كيف تؤدي تطفرات المقاومة المتعاقبة والمفروضة على سلالة تحتاج جزئيا الى مغذيات معينة «brady·troph» الى زيادة انتاج L ـ تيروسين ٠

الجدول (4.1)

تتابع الطفرات نحو الافراط في انتاج التيروسين

تتابع الطفرات	L- تيروسين (غم / لتر)
Corynebacterium glutamicum (نوع بري)	1.0 >
↓	
تحتاج جزئياً الى فنيل الانين	3.0
↓	
مقاومة تجاه 3- أمينو -L- تيروسين	5.7
↓	
مقاومة تجاه p- أمينو -DL- فنيل الانين	7.5
↓	
ة تجاه p- فلورو -DL- فنيل الانين	12.2
↓	
مقاومة تجاه L- تيروسين هيدروكسامات	13.5

ويعد تغيير النفاذية مهما جدا في انتاج حامض L- جلوتاميك ، الحامض الاميني المهم تجاريا ٠ وينتج سنويا حوالي 250000 طن من ممزز النكهة الفعال جلوتامات احادي الصوديوم وذلك بواسطة التخمر ٠ وقد اكتشف حامض الجلوتاميك بواسطة Kinoshita و Udaka و Shimono في بحث نشر عام 1957 ٠ ورغم ان أجناسا وأنواعا عديدة تقع في مجموعة المفرطات في أنتاج الجلوتامات مثل أنواع من **Micrococcus** و **Corynebacterium** و **Brevibacterium** و **Microbacterium** الا أنها جميعا متماثلة من الناحية التصنيفية وينبغي أن تضم تحت جنس واحد ٠ ولجميع المفرطات في انتاج الجلوتامات عائق في دورة حامض ثلاثي الكربوكسيل بمعنى أفتقارها الى أنزيم ∝- كيتوجلوتارات ديهيدروجينيز ، وعليه يتم تحويل دفق الكربون نحو حامض الجلوتاميك ٠ وعادة لا يحدث فرط انتاج حامض الجلوتاميك بسبب تنظيم التغذية الاسترجاعية ٠ ومع ذلك نتيجة لانخفاض تأثير المائق تجاه الممر الخارجي ، فان الجلوتامات تترك الخلية مسببة في ان تخليقها يجري بلا حدود ٠ ان النفاذية يتأثر عمدا بواسطة معالجات مختلفة من ضمنها حرمان البيوتين (جميع مفرزات الجلوتامات تحتاج الى البيوتين) ، وحرمان الجليسرول من الكائنات التي تحتاج اليه او اضافة البنسلين او مشتقات الاحماض الدهنية الى الخلايا النامية في طورها اللوغارتيمي ٠ ومن الناحية الظاهرية فان جميع هذه المعالجات تسبب نقص الفوسفوليبيد من الغشاء السايتوبلازمي الذي يشجع خروج الجلوتامات من الخلية ٠

ان الكمية الضخمة من الحبوب المستهلكة في العالم تفتقر الى الحامض الاميني الاساسي لايسين ٠ ويحول التدعيم باللايسين مثل هذه الحبوب الى غذاء أو علف متوازن ٠ ويعود الفضل في ذلك الى اكتشاف الباحثين **Kinoshita** و **Nakayama** و **Kitada** عام **1958** حيث ان الطفرات المحتاجة الى هوموسيرين المائدة للكائن الحي المجهري المفرط في انتاج الجلوماتات ،

Corynebacterium glutamicum ، تنتج مقادير من اللايسين عندما تنمى تحت ظروف مناسبة حيث يتيسر تخمر فعال يمتاز بأنتاجه لاكثر من 50 غم لايسين / لتر وبحصيلة وزنية قدرها 25% من الجلوكوز المستهلك ٠

وقد اثبتت المفرطات في انتاج الجلوتامات ، عندما يتم احداث طفرة فيها من أجل فقد انزيم هوموسيرين ديهيدروجينيز ، انها أفضل المفرطات في انتاج اللايسين • ومع ذلك ينبغي توفير تراكيز من البيوتين مثلى لعملية النمو في المزرعة • واذا توفرت تراكيز دون المثلى فان حامض الجلوتاميك هو الذي يفرز وليس اللايسين • وبصورة مماثلة اذ أضيف البنسلين الى الكائن C. glutamicum الخالي من الهوموسيرين والنامي في بيئة تحتوي على تركيز مثالي من البيوتين سينتج حامض الجلوتاميك • والسبب هو أن تمثيل النتروجين من قبل المفرطات في انتاج الجلوتامات يحدث فقط خلال عملية اضافة الامين المختزلة لمركب ألفا - كيتوجلوتارات ليتحول الى جلوتامات • ويحفز هذا التفاعل بواسطة NADP المرتبط بجلوتامات ديهيدروجينيز • وهكذا فان نتروجين جميع الاحماض الامينية الطبيعية يشتق من الجلوتامات الداخلية بواسطة عملية نقل الامين transamination وعندما تتغير ميكانيكية النفاذية بواسطة تحديد البيوتين أو اضافة البنسلين ، فان الجلوتامات تفقد من الخلية ولا تصبح متيسرة كمانحة نتروجين ضمن الخلية من أجل تخليق اللايسين •

ان الطريق نحو الافراط في انتاج اللايسين هو بتجنب تثبيط التغذية الاسترجاعية feedback inhibion بواسطة :-

(أ) تحديد مثبط التغذية الاسترجاعية لانزيم اسبارتوكينيز •

(ب) امتلاك انزيم ديهيدرو داي بيكولينات سينثيتيز غير الحساس للتغذية الاسترجاعية •

وينتمي اللايسين الى عائلة حامض الاسبارتيك لكونه ينتج من الاسبارتات بطريق متفرع مع الثريونين والميثيونين والايسوليوسين •

4 . نيوكليوتيدات النكهة Flavor Nucleotides

يعزى الأهتمام بتخمرات النيوكليوتيد الى قدرة بيورينات رايبونيوكليوسيد -5- احادي الفوسفات الثلاثة وهي :- حامض الجوانيليك (جوانوسين - 5- أحادي الفوسفات(GMP) وحامض الاينوسينيك (اينوسين -5- أحادي الفوسفات ، IMP) وحامض الزانثيليك (زانثوسين -5- احادي الفوسفات ، XMP) ، في تعزيز

النكهــة (مرتبـة تنـازليا تبعـا لفعاليتها) • وبالرغـم من كـون ديوكسي رايبونيوكليوتيدات المناظرة فعالة ايضا الا ان المركبات التالية لا تعد فعالة وهي : ادينوسين -5- احادي الفوسفات (AMP) والايسومرات 2 و 3 والنيوكليوسيدات والقواعد الحرة ، ومشتقات البيريميدين •

وكان الكثير من الابحاث الاولية عن انتاج النيوكليوتيدات يدور حول افراز مشتقات النيوكليوتيد الناشئة عن تكسر حامض الرايبونيوكليك أثناء حالات الاجهاد• وفيما بعد تحول الامر نحـو التخمرات المباشرة للسكريات لانتـاج نيوكليوسيدات البيورين والنيوكليوتيدات بواسطة المتطفرات البكتيرية mutants .

ان الطريق نحـو التكديس الفعال للبيورين هو تحـديد GMP |AMP ضمن الخلية ويكون هذا التحديد أكثر تأثيرا بواسطة تقييد تغذية الكائنـات المتطلبـة للبيورين •وهكذا فان الكائنات الطفرية التي تحتاج الى الادنيين تكون هايبوزانثين واينوسين الناتجين من تكسر IMP المتجمع داخل الخلية •

وحتى عام 1964 لم تعرف طريقة ناجحة لتخمر مباشر تـؤدي الى انتـاج النيوكليوتيدات • وقد جاء التقدم المهم مع اكتشاف المفرطات في انتاج الجلوتامات التي يمكنها افراز نيوكليوتيدات سليمة • وعند تنمية البكتريا C.glutamicum التي تحتاج الى الادينين في بيئة تحتوي على تركيز نمو مثالي من البيوتين فانه ينتج IMP • كما وجد ان GMP ينتج بشكل أفضل بواسطة التخليق المسعود أو الانقاذي Salvage Synthesis باستخدام البكتريا Brevibacterium ammoniagenes وتفاعل التخليق الانقاذي هو كالاتي : —

Purine + PRPP ⟶ Purine nucleotide + Pyrophosphate

(فوسفورايبوسيل

بيروفوسفات)

وقد عرف هذا التخليق لسنوات بأنه يجري داخل خلايا الاحياء المجهرية المجهزة بالبيورينات المنجزة • واقيم الدليل على ذلك بواسطة مستخلصات خالية من الخلايا وبواسطة انزيمات منقاة ولكن معروفة بعدم عملها خارج الخلايا ، مع خلايا سليمة لم تعط لها PRPP وقد وجد الباحثون فيما بعد ، عندما تـم استيفـاء بعض

الاحماض التخمرية ، انه يمكن اضافة عدة قواعد بيورينية الى مزارع برية من B.ammoniagenes لتحويلها الى نيوكليوتيداتها الخاصة • وهكذا فان GMP الذي يعد اهم نكهة نيوكليوتيدي فعال يمكن ان ينتج باضافة الجوانين الى خلايا B. ammoniagenes

5 . الفيتامينات Vitamins

ينتج الرايبوفلافين (فيتامين B_2) تجاريا بواسطة التخمر والتخليق الكيمياوي على حد سواء • وعموما يستخدم الفيتامين المخلق كيمياويا في صناعة العقاقير والادوية والاغذية ، في حين يستخدم الرايبوفلافين المنتج بواسطة التخمر في تغذية الحيوان •

وبصورة عامة يوجد الفيتامين في خلايا الاحياء المجهرية بصورة مرافقات انزيمية مثل فلافين احادي النيوكليوتيد (FMN) وفلافين ادنيين نيوكليوتيد(FAD) التي ترتبط مع البروتين • وتحتوي المفرطات في انتاج الرايبوفلافين قدرا من FM وFAD يماثل ما تحتويه الاحياء المجهرية الاعتيادية الا انها تمتلك داخلها قدرا اكبر من الرايبوفلافين الحر • وتمزز الاحياء المجهرية الاعتيادية مقدارا يقل عن 10 ملغم من الرايبوفلافين / لتر • ويمكن تقسيم الاحياء المجهرية المفرطة في انتاج الرايبوفلافين الى ثلاث مجاميع :

(1) المفرطات في الانتاج الواطئة وتضم بكتريا الكلوستريديا clostridia التي يمكنها انتاج حوالي 100 ملغم / لتر تحت افضل الظروف •

(2) المفرطات في الانتاج المعتدلة مثل الخمائر وخصوصا انواع جنس Candida التي يمكنها انتاج ما يقارب 600 ملغم رايبوفلافين / لتر •

(3) المفرطات في الانتاج العالية وتضم نوعين من الاعفان الشبيهه بالخمائر yeast-like molds وهما Ermothecium ashbyii و Ashbya gossypii ، ويمكنها تخليق الرايبوفلافين بتراكيز تزيد على 10000 ملغم/لتر • ويبدو ان الطريق الكيموحيوي الاساسي نحو الافراط في انتاج الرايبوفلافين يتضمن وجود الحديد • حيث أن أيونات الحديدوز تثبط بشدة انتاج الرايبوفلافين بواسطة المفرطات في الانتاج الواطئة ، كما تثبط تكوينه بواسطة

المفرملات في الانتاج المتدلة بدرجة اقل ، في حين ليس لها اي فعل تثبيطي تجاه E. ashbyii و A. gossypi ٠

وهناك فرضية تقترح بأن معقد الحديد ـ فلافوبروتين يعد كابحا لتخليق الرايبوفلافين واذا كان مثل هذا المعقد الحديد ـ فلافوبروتين انزيمي أو غير انزيمي هو كابح تخليق الرايبوفلافين ، فان النمو في بيئة تفتقر الى الحديد سيعطي خلايا بكابح بسيط أو بدونه وبالتالي لن يكبح تخليق الفلافين ٠

والفرضية الاخرى هي أن الحديد يكبح انزيمات التخليق الحيوي للرايبوفلافين حيث يثبط الرايبوفلافين أو أي مشتق آخر الانزيم الاول في المسار الحيوي ٠

ويعد فيتامين B_{12} الفيتامين الاخر الذي أنتج بواسطة التخمر ٠ وقد استخدم نوعان مختلفان جدا من البكتريا في هذه الصناعة وهما :
Propionibacterium shermanii و Pseudomonas denitrificans ٠
ان الطريق الى تخمر P. shermanii هو تفادي كبح التغذية الاسترجاعية بواسطة فيتامين B_{12} ٠ وعليه تجرى المرحلة المبكرة تحت ظروف لا هوائية في غياب المولد أو المقدم precursor ، 5,6ـ ثنائي مثيل بنزيميدازول ٠ وتمنع هذه الظروف تخليق فيتامين B_{12} وتسمح بتجميع المادة الوسطية كوبن أميد Cobinamide ٠ ثم يسمح بمرور الهواء مع أضافة ثنائي بنزيميدازول الذي يؤدي الى تحويل الكوبن أميد الى الفيتامين ٠ وفي تخمر P.denitrificans تجري العملية كلية تحت ظروف نقل أوكسجين واطئة ولكن الطريق الى التخمر هو مانع المثيل ، البيتين betaine (او الكولين) ٠ ويعتمد تكوين فيتامين B_{12} بواسطة P. denitrificans كليا على البيتين أو الكولين ، الا أن ميكانيكية التحكم غير معروفة تماما ٠

6 ـ الاحماض العضوية Organic Acids

تستخدم الفطريات الخيطية Filamentous fungi بدرجة كبيرة في الانتاج التجاري للاحماض العضوية ٠ وفيما يتعلق بالمقادير المنتجة ، يبدو ان حامض الستريك هو المنتوج الرئيس المصنوع بواسطة الفطريات الخيطية ٠ ويقدر الانتاج من حامض الستريك بأنه يزيد عن 100000 طن سنويا ٠ وتستخدم العملية

التجارية لتخمر حامض الستريك الفطر **Aspergillus niger** أو أحـــد أنواعه الطفرية • وقد طورت طرائق متعددة لانتاج حامض الستريك منها : طريقة تخمر كوجي Koji ، وطريقة المزرعة السائلة في الاحواض الضحلة ، وطريقة التخمر المغمور •

وقد أثبت Shu و Johnson عـام 1948 ان أنتـاج حامض الستريك فـي المزرعة المغمورة يجري في بيئة تفتقر الى الحديد والمنجنيز • ان السمات الرئيسة للتخمر هي تركيز ابتدائي عال من السكر (حوالي 15%) ومستويات واطئـة من المنجنيز والحديد و pH اوطأ من 3.5 • وعادة تجهز الفوسفات والنتروجين بمستويات واطئة • وتكون درجة حرارة التحضين حوالي 30°م كما يتطلب وجود ظروف هوائية عالية • وبعد حوالي 8-10 أيام يتحول الجزء الاعظم من السكر (80-90%) الى حامض الستريك وتصل قيمة التصنيع الى حوالي 100 غم/لتر • وحامض الستريك سهل التمثيل ، لذيذ المذاق ، وبناء على ذلك فانه كثير الاستعمال في صناعة الاغذية والعقاقير • اذ يستخدم حامض الستريك كعامل تحميض ومعزز للنكهة ، كما يعمـل كمضاد للاكسـدة لتثبيط التزنـخ في الدهـون والزيوت • ويستخدم حامض الستريك واملاحه كمحاليل منظمة (بفرات buffers) فـي عـدد كبير من الاغذية • وتستهلك صناعة الادوية لوحـدها حـوالي 16% من الانتاج المتيسر من حامض الستريك •

وفي السنوات الاخيرة طورت طرائق جديدة لانتاج حامض الستريك بواسطة خمائر الـ **Candida** وخصوصا من الهيدروكربونات • وبامكان مثل هذه الخمائر تحـويل البرافينات العـادية الى حامض الستريك والايسوستريك بحصيلة عاليـة جـدا (150-170% على أساس الوزن) • ويفضل انتاج حامض الستريـك على حامض الايسوستريك بانتخاب طفرات تفتقر الى انزيم اكونيتيز •

7 . التحولات الحيوية Bioconversions

فضلا عن تتابع التفاعلات المتعددة للتخمرات ، فان الاحياء المجهرية تعـد مفيدة في أجراء عمليات يتحول فيها المركب الى منتوج مقارب من الناحية التركيبية باستخدام انزيم واحد أو عدد بسيط من الانزيمات الموجودة في الخلايا • ويطلق

على مثل هذه العمليات مصطلح التحولات الحيوية Bioconversions
التحولات الميكروبية Microbial Tramsfromation التي قد تجري مع الخلايا النامية أو الخلايا المستريحة أو السبورات أو الخلايا الجافة ۰ ومن أولى التحولات الحيوية المعروفة هو التحويل الكمي للايثانول الى الخل بواسطة بكتريا حامض الخليك ۰ وتعد هذه المجموعة من البكتريا مفيدة وخاصة في اجراء عمليات الاكسدة غير الكاملة للمركبات العضوية وتستخدم تجاريا في أكسدة السوربيتول الى السوربوز ، وهي العملية البيولوجية الوحيدة في طريقة الانتاج الكيمياوية الاخرى لحامض الاسكوربيك (فيتامين C) ۰

وتعد أحياء التحويل الحيوي معروفة لكل الانواع المهمة من التفاعلات الكيمياوية ۰ وتكون التفاعلات متخصصة ، وتتمثل ذروة تخصصها في التحولات الحيوية للستيرويدات ۰ وينتشر هذا التخصص في فصل المخاليط الراسيمية للاحماض الامينية وكذلك المواد الوسطية من تخليق البروستاجلاندين ۰

ويفضل تفاعل التحويل الحيوي في حالات كثيرة على الخطوة الكيمياوية عندما يتاق الى أيسومر خاص وليس الى مخلوط راسيمي ۰ وتتميز التحولات الحيوية بحصيلة عالية وكما هو موضح في الجدول (5.1) ۰
وتضم الميزات الاخرى ظروف تفاعل معتدلة وازدواج التفاعلات المستخدمة لكائن حي مجهري يحتوي على عدة انزيمات تعمل بصورة متسلسلة ۰

ومن الاهمية بمكان عند تطوير التحولات الحيوية فحص تنظيم التخليق الانزيمي أثناء النمو لكون نوعية تعداد خلايا التحويل الحيوي تعتمد على تركيز الانزيم في هذه الخلايا ۰ وغالبا ما تكون المحفزات مفيدة كما تعد شيئا أساسيا وملحا لتجنب كبح مواد الايض الهدمي ۰ ويمكن احداث طفرات لحذف الايض الهدمي الاضافي للناتج المرغوب ۰ وغالبا ما تعد النفاذية مشكلة فيما يتعلق بتلامس مادة التفاعل مع الانزيم في الخلية ۰

وفي بعض الحالات استخدم النقص في Mn^{2+} او اضافة العوامل النشطة سطحيا لخفض تأثير عائق النفاذية ۰ كما قد يكون من المرغوب في احيان اخرى تنمية الخلايا على مادة تفاعل معينة وتحويل مادة تفاعل مختلفة ، وتعرف هذه العملية بال Cometabolism ۰ وقد حلت بعض مشاكل تثبيط ناتج التحولات

الجدول (5.1)

حصيلة بعض التحولات الحيوية

مادة التفاعل	الناتج	الكائن الحي المجهري	الحصيلة الوزنية (%)
سوربيتول	سوربوز	Gluconobacter suboxydans	98
مانيتول	فركتوز	Gluconbacter suboxydans	95
جليسرول	ثنائي هيدروكسي أسيتون	Gluconobacter suboxydans	95
جلوكوز	حامض 5- كيتوجلوكونيك	Gluconobacter suboxydans	90
جلوكوز	حامض 2- كيتوجلوكونيك	Pseudomonas mildenbergii	100
جلوكوز	حامض الجلوكونيك	Aspergillus niger	97
L- تيروسين	L- دوبا	Aspergillus oryzae	100
بروجستيرون	11 α هيدروكسي بروجستيرون	Rhizopus nigricans	90

الحيوية بأضافة راتنجات التبادل الايوني أو بواسطة مزرعة الفصل الغشائي · كما استخدمت المزارع المختلطة او الاضافة المتعاقبة للخلايا لاجراء التحولات الحيويـة المتضمنة عدة خطوات بشكل سلسلي والمحفزة بواسطة مزارع مختلطة · كما يمكـن حل مشكلة مواد التفاعل غير الذائبة ، خصوصا تلك السائدة في حقل الستيرويدات باستخدام معلقات موزعة بدقة من مواد التفاعل ، أو معلقات في عوامـل النشاط السطحي مثل التوينات Tweens ، أو المعقدات الذائبة أو استرات مواد التفاعل ·

وفي السنوات الاخيرة حدث تقدم واهتمام كبيران جدا في مجال الخلايـا المثبتة (غير الطليقة) immobilized cells لاجراء مثل هـذه العمليات · وعادة ما تكون هذه الخلايا اكثر ثباتا من الخلايا الحرة او الانزيمات ، كما تعد أكثر اقتصادية من الانزيمات المثبتة immobilized enzymes ·

وينتج حامض الجلوكونيك عن طريق التحويل الحيوي للجلوكوز بواسطة عدد كبير من الفطريات بضمنها مجموعة **Aspergillus niger** فضلا عن انـواع عديدة من جنس **Penicillum** · وفي الغالب تحتوي البيئة على تراكيز من الجلوكوز تصل الى حوالي 30% · ويستخدم حامض الجلوكونيك في صورة ملحة الكالسيومي في حالات نقص الكالسيوم · وتستخدم جلوكونات الصوديوم كعامـل فصل او عزل لمنع ترسيب زبد الصابون soap scum على السطوح النظيفة · كما وجد الحامض الحر طريقا للاستخدام كعامل تحميض معتدل في عدد من العمليات الصناعية (مثل تصنيع المعادن ، ودباغة الجلود ، والاغذية) ·

8- المذيبات Solvents

يمثل الكحول الاثيلي مادة ايضية اولية يمكن انتاجها بواسطة تخمر ايـة مادة كربوهيدراتية تحتوي على سكر قابل التخمر او سكر متعدد يمكنه ان يتحـول الى سكر قابل التخمر · وتفضل الخمائر في هذه التخمرات غير ان الانواع المستخدمة تتحـدد بواسـطة مادة التفاعـل المضـافة الى البيئة · وعمـوما تسـتخدم خميرة **Saccharomyces cerevisiae** عند انتاج الكحول من تخمر الهكسـوزات ، في حين تستخدم خميرة **Kluyveromyces fragilis** في انتاج الكحول من سكر اللاكتوز ·

وتحت الظروف المثلى وضمن فترة زمنية واضحة يتحصل بسهولة على حوالي 10 الى 12% كحول بالحجم ، ويبطيء هذا التركيز الكحولي من النمو ويتوقف التخمر. ويمكن للتخمر ان يستمر باستخدام انواع معينة من الخمائر الى تراكيز كحولية قد تصل الى 20% بالحجم • وتتحقق هذه التراكيز بعد أشهر أو سنوات من التخمر ، كما في حالة الانبذة • وبصورة عامة يتم الانتاج التجاري للكحول بواسطة التخمر خلال فترة خمسة ايام ، وتصل التراكيز الكحولية الى حوالي 12% بالحجم •

وفي الوقت الحاضر يصنع الكحول بالدرجة الاساس بواسطة الصناعة البتروكيمياوية من الايثلين • ومع ذلك وفي ظل الاسعار المتزايدة للبترول والغزارة المتوقعة في أنتاج الحبوب والمخلفات النباتية يبدو من المرجح أن تستعيد صناعة الكحول الايثلي بواسطة التخمر مكانتها السابقة وتشير الدلائل الى أن العملية التخمرية ستتنافس مع العمليات الكيمياوية الصناعية • وفي هذا المجال فان بكتريا الكلوستريديا يعاد حاليا فحصها واختبارها بعد سنوات من الاهمال • وتتمكن بكتريا Clostridium thermocelum وهي بكتريا لا هوائية محبة للحرارة العالية أن تحول المخلفات السليلوزية الى الكحول مباشرة • وتنتج الكلوستريديا الاخرى مركبات مثل الخلات واللاكتات والاسيتون والبيوتانول التي ستستخدم أكثر فأكثر مع تعمق ازمة الوقود السائل •

9 . بروتين الخلية الواحدة Single Cell Protein

يعد بروتين الخلية الواحدة أحد المنتجات الاولية لايض الاحياء المجهرية وهو استخدام آخر مفيد لخلايا الاحياء المجهرية من أجل توفير البروتينات لتغذية الحيوانات وفي آخر الامر في تغذية الانسان • وقد ضمت هذه المنتجات الخلوية تحت تسمية بروتين الخلية الواحدة Single Cell Protein حيث تحتوي الخلايا على ما يقارب 50-85% بروتين خام • ولهذه البروتينات محتوى عال من الاحماض الامينية فضلا عن الفيتامينات والمعادن ومصادر الطاقة كالليبيدات والكربوهيدرات • ويعد محتواها العالي من الحامض الاميني لايسين ذا أهمية

بالغة جدا في طريقة استعمالها والاستفادة منها · ويمكن تحضير بروتين الخلية الواحدة من البكتريا والخمائر والاعفان والطحالب · وقد جرى العديد من الابحاث في هذا المجال عن انتاج بروتين الخلية الواحدة باستخدام بيئات غذائية متنوعة (كمصادر كربونية) سواء كانت مخلفات زراعية أو صناعية أو مشتقات الصناعات البتروكيمياوية ، فضلا عن ايجاد أفضل كائن حي مجهري (سواء بالغربلة والانتخاب أو بواسطة الطفرات) يمكنه الاستفادة من هذه البيئات الغذائية لاعطاء أعلى انتاج من الكتلة الخلوية تحت ظروف أنتاج معينة ومسيطر عليها وباقل النفقات · وعليه فان النجاح التجاري لبروتين الخلية الواحدة يعتمد بالدرجة الاساس على اقتصاديات منطقة الانتاج · وينبغي الالتفات الى القيمة الهائلة للخلايا الميكروبية في حقل معاملة المخلفات sewage treatment ، حيث من الاهمية الخاصة استخدام مثل هذه العمليات في آن واحد لانتاج الطاقة في صورة غاز الميثان ·



الفصل الثاني

المنتجات الثانوية لايض الاحياء المجهرية

Secondary Products of Microbial Metabolism

1 مقـــدمة

2 طبيعة المنتجات الثانوية لايض الاحياء المجهرية

3 المضـادات الحيوية

4 تخمرات الانزيمات

1. مقدمة Introduction

تعرف المنتجات الثانوية لايض الاحياء المجهرية بأنها المركبات ذات الـوزن الجزيئي المنخفض غير اللازمة للنمو في المزارع النقية . وتتباين المنتجات الثانوية الايضية للاحيـاء المجهـرية كثيرا فـي تركيبها ، فهي تشـمل المضادات الحيـوية Antibiotics ، والسموم (توكسينات) Toxins ، والقلويدات Alkaloids ، وعوامل النمو النباتية ، والانزيمات ، والخضاب وغيرها مما لها اهمية اقتصادية كبيرة جدا . ويتم انتاج مثـل هـذه المـواد الايضية التي تعـرف أيضـا باسـم Idiolites بواسطة مجاميع متعددة التصنيف وتوجد غالبا كخليط من المـواد القريبة الشبه من الناحية الكيمياوية . وتنخفض القـدرة على الانتـاج بواسـطة التطفر الذاتي أو التلقائي Spontaneous Mutation (أو فقدان البلازميد) نظرا لكون أغلب المتطفرات ضعيفة في قدرتها الانتاجية .

2. طبيعة المنتجات الثانوية لايض الاحياء المجهرية
Nature of Secondary Products of Microbial Metabolism

ان رائدي تطوير مفهوم المواد الايضية الاولية والثانوية للاحياء المجهـرية هما عالم الكيمياء الحيوية الميكروبية البريطاني John D. Bu Lock وعالم الفسلجة الميكروبية الامريكي Arnold L. Demain حيث نشرا ابحاثا واستعراضات عـن الايض الثانوي للاحياء المجهرية (Bu Lock, 1961, 1965 a, 1965 b, Demain; 1975, 1968, 1972, 1974, Demain,Drew, 1977) .

كما أن أبحاثهما واستعراضاتهما المنشورة حديثا يوصى بها لمزيد من القراءة والاطلاع من قبل اي مهتم في الايض الثانوي للاحياء المجهرية .

ان القدرة على انتاج مواد ايضية ثانوية تسود في الغالب بين البكتريـا وخصوصا الاكتينوميسيتات ، فضلا عن الفطريات الخيطية . وأن القدرة بين أنواع الفطريات الخيطية على انتاج قسم واحد من المواد الايضية الثانوية الذي يطلق عليه اسم المضادات الحيوية تبدو متساوية التوزيع . وهكذا فان انواعا من رتبـة Moniliales (التابعة للفطريات الناقصة) والفطريات البازيدية تنتج عـددا من المضادات الحيوية اكثر من انواع المجموعة الفطرية الاخرى .

وعندما يمتلك كائن حي مجهري معلومات وراثية من اجل تخليق واحـد او

أكثر من المواد الايضية الثانوية ، فان التعبير عن تلك المعلومات يتنظم بواسطة عدد من العوامل البيئية التي يستطيع بعضها او جميعها تأخير معدل النمو •

وغالبا ما يسيطر على انتاج الاحياء المجهرية الايضية الثانوية بطريقة حرجة بالسيطرة على تركيز بعض الكاتيونات في البيئة • ومن الامور المسلم بها خلال العقود الثلاثة الاخيرة ان البحث عن تأثير المعادن النادرة في انتاج المواد الايضية الثانوية كان يجري بطريقة متقطعة وعابرة ، الا أن هذا لم يمنع الباحثين من مواصلة دراسة تأثير هذه المعادن وخصوصا التراكيز المؤثرة في حدود الميكرومول •

ويمكن السيطرة على الطبيعة الكيمياوية للمواد الايضية الثانوية التي تفرزها الاحياء المجهرية بواسطة الدرجة التي يتحدد عندها النمو • وجاء افضل مثال عن هذه الظاهرة من المشاهدات عن مزارع **Gibberella fujikuroi** التي تنتج نوعين مختلفين من المواد الايضية الثانوية هما خضاب البوليكيتيد Polyketide المعروفة باسم بيكافيرينات Bikaverins والجبريلينات ثنائية التربينويد المشجعة لنمو النباتات • فعندما ينمو هذا العفن في مزرعة الوجبة الواحدة تحت ظروف تحديد نتروجيني متزايد ، يفرز أولا بيكافيرينات وبعدها يتوقف تخليق هذا الخضاب وتحت ظروف شديدة التحديد للنتروجين يتم افراز الجبريلينات •

والامر الذي لا يدعو الى الدهشة ، ان يكون الحد الفاصل بين المنتجات الاولية والثانوية لايض الاحياء المجهرية غامضا • حيث يعتبر بعض الباحثين عددا من المنتجات الاولية منتجات ثانوية • فمثلا في حالة حامض الايتاكونيك Itaconic acid نجد ان المسار الرئيس للايض الثانوي في بعض انواع عفن **Aspergillus** يتضمن فضلا عن المجموعة الكاملة الاعتيادية لانزيمات دورة حامض الستريك اضافة انزيم آخر يحفز عملية ازالة الكربوكسيل Decarboxylation من سيس-اكونيتات لاعطاء حامض الايتاكونيك •

وأخيرا هناك سؤال مثير هو لماذا تقوم الاحياء المجهرية بتخليق المواد الايضية الثانوية ؟

لقد قدمت عدة تفسيرات ولكن من أكثرها قبولا لدى معظم المهتمين بفسلجة الاحياء المجهرية هو أن عملية الايض الثانوي تكون هي مهمة الكائن الحي المجهري وليس الطبيعة الكيمياوية للمادة الايضية • وهذا التفسير يقترح ان الاحياء المجهرية

الداخلة في طور النمو الثابت وغير القادرة على انتاج المواد الوسطية ذات الاوزان الجزيئية المنخفضة اللازمة خلال النمو لتخليق مكونات الخلية ، تحول هذه المولدات الى مركبات مفيدة وغير ضارة لا تكبح تخليق المركبات ذات الاوزان الجـــزيئية المنخفضة ٠

3. المضادات الحيوية Antibiotics

تعد المضادات الحيوية أفضل مثال عن المواد المعروفة باسم Idiolites ، اذ تمثل أكثر المجاميع أهمية من بين المواد الايضية الثانوية ٠ وقد استخدم مصطلح « مضاد حيوي Antibiotic » لاول مرة من قبل Waksman عـام 1942 ويعرف بأنه ذلك المركب الكيمياوي المنتج من قبل كائن حي مجهري له القدرة على تثبيط نمو البكتريا والاحياء المجهرية الاخرى في المحاليل المنخفضة بل وقتلها ٠
ان تحديدات أو تقييدات هذا التعريف واضحة جدا ، فهو يستثني عوامل العـلاج الكيمياوية المخلقة النقية كعقاقير السلفا Sulpha drugs فضلا عن العـــوامل المضـادة للاحياء المجهرية المنتجة بواسطة الاحياء الاكثر رقيا وتشمل الكوينين Quinine واللايسوزايم Lysozyme ٠

يوجـد في الوقت الحاضر حـوالي 5500 مضـاد حيـوي ، حيث تشـارك الاكتينوميسيتات لوحدها بحوالي 4000 مضاد حيوي ٠ ولا يزال العمل مسـتمرا لاكتشاف المزيد من المضادات الحيوية الجديدة وبمعدل يصل الى 300 مضاد حيوي سنويا ٠
وتعـد بعض الانـواع مثل Streptomyces griseus و Bacillus subtilis مفـرطة جدا في الانتاج ، اذ ينتج كل منهما أكثر من مضادا حيويا مختلفا ٠ وفي عالم المضادات الحيوية الناجحة تجاريا ، يعد جنس Streptomyces في المقام الاول اذ يجهز حوالي 75% من 100 منتوج موجود في السوق ٠

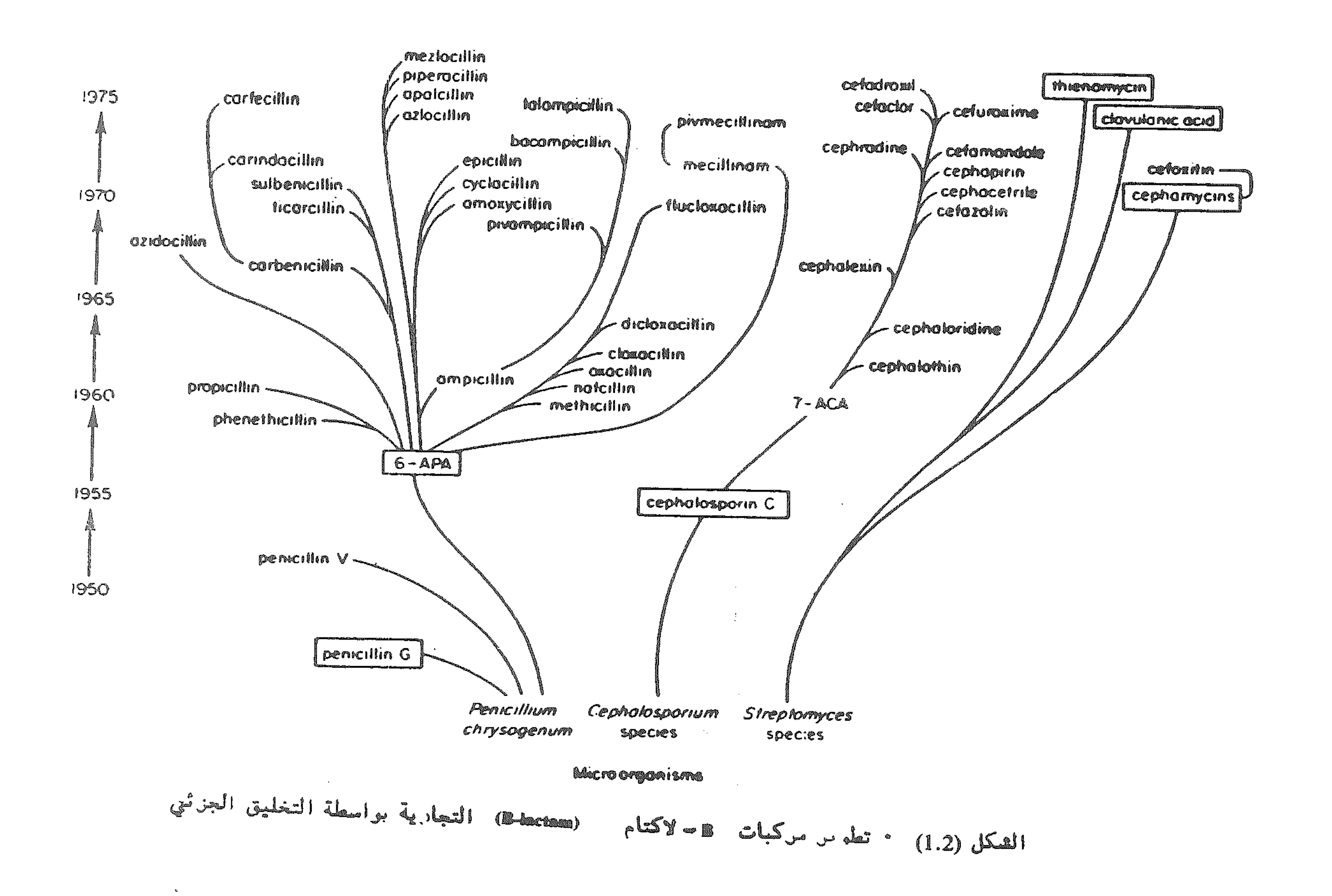
وفي عام 1980 قدر انتاج المضادات الحيوية المنتشرة على نطاق العـالم بحـوالي 25000 طن ٠ ويتضمن هـذا الرقـم 17000 طن من البنسلينات Pencillins و 5000 طن من التتراسيكلينات Tetracyclins و 1200 طن من السيفالوسبورينات Cephalosporins و 800 طـن مـن الاريثروميسينات

Eythromycins • ويستمر البحث من أجل اكتشاف مضادات حيوية جـديدة وذلك بسبب الانواع المقاومة الطبيعية . وتطور المقاومة ، والحاجـة الى منتوجات أكثر أمانا • والعديد من هذه المنتجات معمول من قبل الكيمياويين بواسطة تحوير المضادات الحيـوية الطبيعية ، ويطلـق على هـذه العمليـة بالتخليـق الجـزئي Semisynthesis كما هو موضح في الشكل (1.2) •

وفي عام 1974 وحده تم التحضير بالتخليق الجزئي أكثر من 20000 من البنسلينات و 4000 من السيفالوسبورينات و 2500 من التتراسيكلينات و 500 من الكناميسينات Kanamycins . و 500 من الكلوروامفنيكولات Chloroamphenicols ان استعمال المضادات الحيوية لم يقتصر على معالجة الامراض كيمياويا في مجالات الطب البشري والبيطري وانما أيضا في تشجيع النمو لحيوانات الحقل وفي وقاية النباتات •

وفي مزرعة الوجبة الواحدة ، تظهر بعض عمليات المواد الايضية الثانوية طور نمـو محددا Trophophose يتبعـه طـور انتـاج (Idiophase) • ويتداخل الطوران في بعض التخمرات اذ يعتمد توقيت ذلك على الظروف الغذائية السائدة في المزرعة ، وعلى معدل النمو أو على كليهما • ان انتاج المواد الايضية الثانوية من المحتمل أن يعطي الكائـن الحي فرصة تمييز صور الحياة الاخـرى ومنافستها بشكل مؤثر • ويساعد التأخير في أنتاج المضاد الحيوي حتى بعد طور النمو (Trophophase) الكائن المنتج نفسه نظرا لكونه حساسا اثناء النمو اتجاه مضـاده الحيوي • وتتطور المقاومة خـلال طور الانتاج Idiophase • وتتضمن ميكانيكيات المقاومة في الكائنات المنتجة تحويرا كيمياويا للمضاد الحيوي ، وتغيير هدفه الخلوي ، وتناقص المأخوذ من المفرز منه •

ان تطوير عملية ما من أجل الحصول على مـادة أيضية ثانوية قد يسـتلزم اختبار المئات من المضافات كمولدات ممكنة للناتج المرغوب وزيادة كميته • وقـد يعمل المولد على توجيه التخمر اتجاه تكوين ناتج معين واحد مرغوب على حساب النواتج الاخرى ، وهذا ما يعرف بالتخليق الحيوي الموجه Directed Biosynthesis • وكمثـال على ذلك هـو استعمال حامض فنيل أستيك فـي تخمـر البنزيل بنسلين (Penicillin G) • ومع ذلك ففي العديد من التخمرات لا تزيد المولدات المضافة



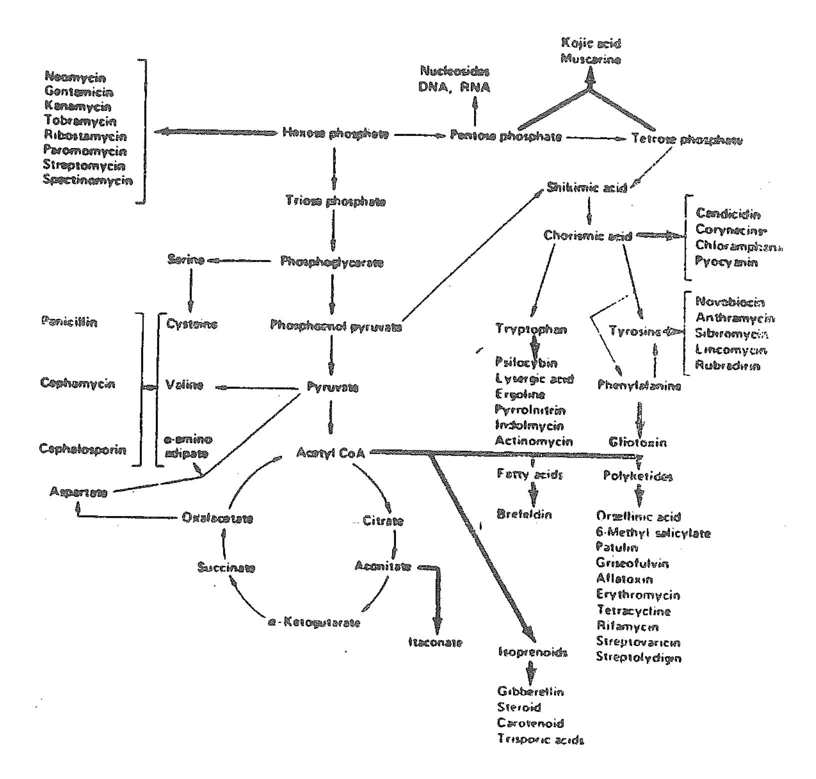
الشكل (1.2) ٠ تطور مركبات B - لاكتام (B-lactam) التجارية بواسطة التخليق الجزئي

من الانتاج أو توجه التخمرات بسبب ان تخليقها لا تعد خطوة محددة المعدل في تكوين الناتج • وفي مثل هذه الحالات غالبا ما تظهر عملية غربلة المضافات تأثيرات مفاجئة من ناحية التحفيز والتثبيط للجزيئات غير المولدة • وتعود هذه التأثيرات الى تداخلات هذه المركبات مع الميكانيكيات المنظمة الموجودة في كائنات التخمير •

وتتضمن الميكانيكيات التي تحكم بدء تخليق المضاد الحيوي كبح وتثبيط انزيمات انتي بيوتك سينثيتيز antibiotic synthetases • وتشير الادلة المتيسرة ان الكبح يعمل عند مستويات النسخ •

ان المواد الاولية للايض الثانوي هي المواد الايضية الاولية ، **الشكل** (2.2) ، والتي غالبا ما تبدي تأثيرات سلبية أو ايجابية في الايض الثانوي • وفي حالة المسارات المتفرعة التي تقود الى المواد الايضية الاولية والثانوية ، فان المواد الايضية الاولية تتداخل في الغالب مع تكوين المواد المسماة **Idiolites** بواسطة تثبيط خطوة بدائية في المسار الشائع وبذلك تمنع تكديس مولد المادة الايضية الثانوية • وعليه في حالة الفطر **Penicillium chrysogenum** تجد ان اللايسين يتداخل مع التخليق الحيوي للبنسلين بواسطة تثبيط وكبح انزيم هوموسترات سينثيز •

وتتضمن الميكانيكيات الخاصة التي تنظم بداية تخليق المضاد الحيوي تنظيم مواد الايض الهدمي الكربونية ومواد الايض النتروجينية ، وتنظيم الفوسفات ، وعملية الحث • ان العدد الكبير من تخمرات المضادات الحيوية الذي يتداخل معها الجلوكوز يشهد على بروز تنظيم مواد الايض الهدمي الكربونية • وقد لوحظت هذه الظاهرة في الايام الاولى من تطوير انتاج البنسلين وسنوات قبل ادراك أهميته العامة • ورغم كون الجلوكوز المستخدم سريعا مادة جيدة للنمو الا انه مادة تفاعل ضعيفة لانتاج البنسلين • ومن الناحية الاخرى يستخدم اللاكتوز ببطء من أجل النمو ولكنه يدعم انتاجا متميزا للبنسلين • وفي يومنا هذا حلت الاضافة البطيئة للجلوكوز محل الاضافة البطيئة للاكتوز (بطريقة الوجبات) في صناعة البنسلين • ان تحديد تركيز الجلوكوز يحافظ ظاهريا على مواد الايض الهدمي التثبيطية والكبحية عند مستوى منخفض • ويمارس ايون الامونيوم وكذلك الاحماض الامينية



الشكل (2.2) • المواد الايضية الاولية كمـولدات للمـــواد الايضية الثـانوية
(تمثل الاسهم السميكة المواد الايضية الثانوية)

السريعة الاستعمال تأثيرات سلبية في الايض الثانوي · وعليه فان المصـــــادر النتروجينية غير الذائبة (وبطيئة الاستعمال) مثل مسحوق فول الصويا تكـون فعالة بشكل ايجابي في التخمرات الصناعية · وكذلك تمارس الفوسفات اللاعضوية تأثيرا سلبيا شديدا في تخمرات المواد الايضية الثانوية بواسطة تنظيم الفوسفاتيز وكذلك بواسطة ميكانيكية غير معروفة قد تتضمن ثلاثي فوسفات الادينوسين أو أي نيوكليوتيد آخر · ومع ذلك كثيرا ما يلاحظ الحث في عمليات الايض الثـانوي رغم كون الميكانيكية غير واضحة في معظم الحالات ·

وبجانب الانواع المعينة من التنظيم الملاحظة اعلاه ، تتم السيطرة على بداية الايض الثانوي بواسطة معدل النمو · وبصورة عامة ، لا تنتج المواد الايضـــية الثانوية عند معدلات نمو قريبة من أقصى معدل للنمو ، لذلك فان معدلات النمو الواطئة تكون ضرورية لاحداث الايض الثانوي · وفي الحقيقة يمكن تحويل طور الانتاج Idiophase الى طور النمو Trophophse عندما تستخدم بيئة تدعم معدلات نمو واطئة فحسب ·

وينتهي التخليق الحيوي للمضاد الحيوي عند انحلال انـزيم انتي بيوتيك سينثيتيز أو بسبب تثبيط التغذية الاسترجاعية وكبح هذه الانزيمات · وعلـى سبيل المثال يحدد تخليق الكلورومفنيكول بواسطة كبح انزيم أريل أمين سينثتيز وكذلك يحدد انتاج القلويدات الايرجوتية Ergot Alkaloids بواسـطة تثبيط انزيم داي مثيل آليل تربتوفان سينثيتيز · وفي كلتا الحالتين تعد هذه الانزيمات ابتدائية للمسار الثانوي ·

ونظرا لسيطرة الميكانيكيات الوراثية ذاتها على انتاج المواد الايضية الاولية والثانوية ، فان التطفر والغربلة من أجل الحصول على مزارع ذات انتاج أفضـل قد عملا على تحسين انتاج المواد المسماة Idiolites · ويعد التطفـــر مسؤولا عما يقارب من 1000-100 مرة من التقدم والتحسين في مجال انتاج المضادات الحيـوية · وقـد خلق التطفر مواد أيضـية ثانـوية جـديدة مثـل 6- دي مثيل كلوروتتراسيكلين و 6- دي مثيل تتراسيكلين ·

والتطور الاخر وهو التخليق الحيوي التطفري Mutational Biosynthesis يستخدم المتطفرات غير القادرة على تكوين جزء من المضاد الحيوي ما لم تزود البيئة

بذلك الجزء ، وبالتالي يضياف Idiotroph مماثل لذلك الجزء المفقود وغالبا ما يندمج في مضاد حيوي جديد . وقد أدى استخدام التخليق الحيوي التطفري الى اكتشاف العديد من المشتقات الجديدة للمضادات الحيوية وخصوصا من مجموعة أمينوسيكليتول Aminocyclitol .

4- تخمرات الانزيمات Enzyme Fermentations

تعد الانزيمات قسما مهما بين منتجات الاحياء المجهرية السائدة . وعموما فان الانزيمات ذات قيمة ونفع كبيرين في التصنيع بسبب نشاطها السريع والمؤثر بتركيزات واطئة وعند ظروف معتدلة من قيم الـ pH ودرجات الحرارة ، ودرجة تخصصها العالية لمادة التفاعل (بحيث تقلل من تكوين النواتج الجانبية) ، وسميتها الضئيلة ، واخيرا سهولة ايقاف نشاطها بمعاملة معتدلة . ومن أكثر الانزيمات التجارية الشائعة هي البروتييزات proteases والاميليزات Amylases والبكتينيزات Pectinases والاميلوجلوكوسيديز Amyloglucosidase وجلوكوزأيسومريز Glucose isomerase (زايلوز أيسومريز Xylose isomerase) والرنين Rennet .

وتعد الصناعات التي تتعامل مع تكسير النشا وتصنيع المنظفات المستفيد الرئيس من الانزيمات الميكروبية . والصناعات المستخدمة لهذه الانزيمات هي : الفاكهة والنبيذ والخبيز والطحن والالبان وصناعات التقطير . وينتج سنويا حوالي 500 طن من بروتييز الباسيلاس Bacillus Protease (على الاساس النقي) ، وينتج اميلوجلوكوسيديز وكذلك أميليز الباسيلاس Bacillus Amylase بحوالي 300 طن سنويا ، وجلوكوز أيسومريز بحوالي 100 طن سنويا .

وتعد الاحياء المجهرية جذابة كمصادر انزيمية لسهولة زيادة تركيز الانزيم بواسطة المعالجة البيئية والوراثية ، وقد تصل هذه الزيادة الى الاف المرات . ومن الطبيعي أن يكون فصل الانزيم اكثر سهولة عند نشاط نوعي Specific Activity اقل . وتستخدم خلايا الاحياء المجهرية كمصادر للانزيمات بسبب قصر مدة التخمر ، ورخص البيئة الغذائية ، وسهولة تطوير أساليب غربلة بسيطة ، ووجود بروتينات متميزة من السلالات المختلفة التي تحفز التفاعل ذاته . وتسمح النقطة الاخيرة

بدرجة من المرونـــة في اختيـــار ظروف التخمر ما دامت هذه الانزيمات يمكن ان تمتلك درجات متباينة من الثبات وال pH والحرارة المثلى ٠

وفي العقد الاخير ، استعملت الانزيمات الميكروبية بشكل متزايد في المجالات التي استعملت فيها الانزيمات النباتية والحيوانية على نحو تقليدي ، وتتضمن هذه التحولات الاحلال الجزئي للاتي :ــ

(1) اميليزات بكتريا Bacillus وعفن Aspergillus محل اميليزات مولت الشعير والقمح في صناعات البيرة والخبيز والنسيج ٠

(2) بروتييزات العفن Aspergillus محل البروتييزات النباتية والحيوانية في الخزن المبرد Chill-proofing للبيرة وتطرية اللحوم ٠

(3) بروتييزات عفن Aspergillus وبكتريا Bacillus محـــل بروتييزات البنكرياس في تطرية الجلود وتحضير المنظفات ٠

(4) رنين عفن Mucor محل رنين المعجول في صناعة الجبن ٠

ان التطبيق الجـــديد الرئيس للانزيمات الميكروبية هـــو اســـتعمال جلوكوز ايسومريز بالاشتراك مع α-أميليز وأميلوجلوكوسيديز لتحويل النشا الى خليط من الجلوكوز والفركتوز المعروف بشراب الذرة العالي الفركتوز ٠ وقد أنتج حوالي 1000000-500000 طن من هذا الشراب المحلي التجاري في الولايات المتحدة الامريكية وحدها عام 1976 ٠ وفي الواقع ان تطور انتاج انزيم جلوكوز أيسومريز قد سمح لصناعة الطحن الرطب للذرة ان تحتل 30% من صناعة السكر في عمل المحليات ٠

وتتضمن التطبيقات الاخرى للانزيمات التي هي قيد الاستعمال الان أو تحت الاختبار ، امينوسيكليز Aminocyclase لفصل احماض DL- الامينية ، وبنسلين أسيليز لانتـــاج البنسلينات شـــبه المخلقـــة ، و B- جالاكتوسيديز للتحلل المائي للاكتوز في الشرش ، وانزيمات لصناعة الاحماض الامينية من المولدات المخلقة ، والانزيمات المســـتخدمة للتحليـــل فـــي الالكترودات الانزيميـــة ، والسيليوليزات ، والهيميسيليوليزات والانزيمات المحللة للجنين وذلك لتحويل المخلفات والمصـــادر القابلة للتجديد الى سكريات ووقود سائل ومواد كيمياوية ٠

ويتزايد الاهتمام في الوقت الحاضر حـــول تثبيت الانزيمات

Enzyme Immobilization ، وهي عملية حجز الانزيم بطريقة تسمح له بالانفصال فيزياويا عن مادة التفاعل والناتج لاعادة استخدامه • وعموما يتم تثبيت الانزيم بارتباطه كيمياويا أو فيزياويا مع مادة ساندة Supprot غير ذائبة أو بحجزه بواسطة غشاء نصف ناضح • وعليه يقال عن الانزيمات غير المثبتة بانها طبيعية native أو ذائبة Soluble • ولتثبيت الانزيمات فوائد عديدة منها :ـ

(1) ازيادة ثباتيتها ، (2) امكانية اجراء عمليات التحويل بصورة مستمرة ، (3) الحصول على نواتج تفاعل أكثر نقاوة ، (4) تقليل مشاكل التدفق Effleunt ، (5) تقليل تثبيط مادة التفاعل ، (6) تقليل تثبيط ناتج التفاعل ، (7) سهولة استرجاعها واعادة استخدامها في عملية تحويل جديدة ، (8) امكانية تثبيت أكثر من انزيم للقيام بأكثر من عملية واحدة •

ومع ذلك فان كلفة اسلوب التثبيت وفقدان النشاط خلال عملية التثبيت تعد عوامل سلبية ينبغي وضعها في الاعتبار • ان المشكلة الرئيسة المحددة لتطور تقنية الانزيمات هو النقص في تيسرها • حيث يتيسر تجاريا حوالي 10% فحسب من حوالي 2000 انزيم مذكور في المراجع •

وقد استثمر التنظيم الوراثي للتخليق الحيوي للانزيمات في تطوير التخمرات الانزيمية • ومن العوامل المهمة المؤثرة في ذلك : الحث الانزيمي ، وكبح التغذية الاسترجاعية ، ومواد الايض الهدمي الكربونية ، وكبح المواد الايضية النتروجينية • وتضاف المواد المحثة من أجل زيادة تكوين الانزيم بمقدار يصل الى 1000 مرة • وكبديل ، تجرى الطفرات بحيث تسمح بانتاج انزيمي عال بدون المادة المحثة • وتتم مقاومة كبح التغذية الاسترجاعية بواسطة اضافة مثبطات المسار ، وتحديد الامداد من عامل النمو الى المتطفر الغذائي (المتطفر ذو القدرة التخليقية الناقصة) Auxotrophic Mutant ، واستخدام المشتقات البطيئة الاستغلال من عامل النمو المطلوب ، أو بالنمو البطيء للمتطفرات المحتاجة جزئيا الى مغذيات معينة Bradytrophic Mutants (المتطفرات ذات القدرة التخليقية الناقصة جزئيا Partial auxotrophs) • ويتم تجنب كبح مواد الايض الهدمي الكربونية ومواد الايض النتروجينية بالاستغلال البطيء للمصادر الكربونية والنتروجينية على التوالي • وتتضمن الحلول الوراثية لمعضلات ميكانيكيات الكبح المختلفة عزل المتطفرات المنظمة التي لا تكون حساسة لمثل عمليات السيطرة هذه •

الفصل الثالث

العوامل الوراثية للاحياء المجهرية

Genetic Factors of Micoorganisms

1. مقـــدمة
2. الاوبيرونات البكترية
3. الجينات المنقودية في الفطريات
4. السيطرة على التعبير عن الجينات في الاحياء المجهرية

1.4. السمات العامة لتنظيم الجينات

2.4. الخواص العامة للجينات القابلة للتنظيم

1. مقدمة Introduction

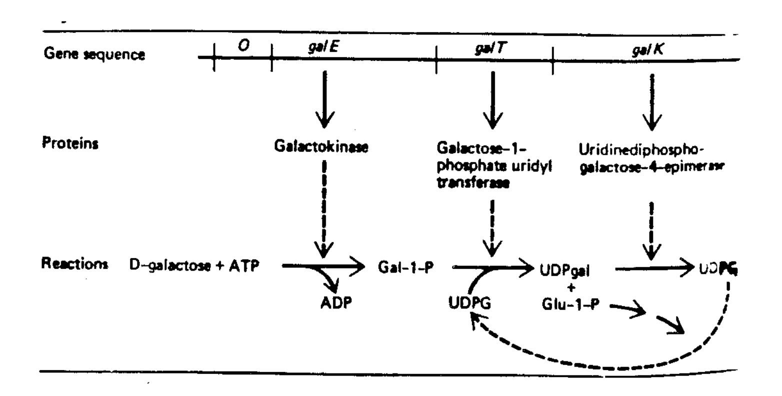
تعد العوامل الوراثية من أهم العوامل المؤثرة في نمو ونشاط وتكاثر الاحياء المجهرية عموما ٠ ويزداد دورها أهمية في الاحياء المجهرية الصناعية اذ غالبا ما تتحدد نوعية وكمية نواتج التخمر بتفاعل العوامل الوراثية والبيئية ٠ وبتقدم علم الوراثة وتشعب فروعه ظهر العديد من الدراسات والابحاث التي تعني بدراسة العوامل الوراثية للاحياء المجهرية واساليب التنظيم والسيطرة عليها حتى اصبح من الممكن القول بأن هناك فرعا من علم الوراثة يدعى « الوراثة الميكروبية Microbial Genetics » ٠ وسنتناول في هذا الفصل السمات المميزة للمادة الوراثية للبكتريا والفطريات دون الغوض في أساسيات علم الوراثة مع التركيز على بعض الجينات المسؤولة عن انتاج أو تكسير مركبات مهمة في مجال الميكروبيولوجي الصناعي ٠

كذلك فان للسيطرة على الجينات الميكروبية وأساليب تنظيم التعبير عنها دورا مهما في تحديد تركيب وسط التخمر وبالتالي نوعية وكمية النواتج ٠ ان التنويه عن هذه العوامل يعد مدخلا لا غنى عنه الى الاتجاهات البحثية الحديثة المتبعة في سيطرة الانسان وتحكمه في المادة الوراثية للاحياء المجهرية بما في ذلك ابتكار واستنباط السلالات ذات الصفات المرغوبة من ناحية احتياجاتها الغذائية أو قدرتها على انتاج كميات من ناتج التخمر تفوق بكثير الكميات المعتادة (المفرطات في الانتاج Hyper-producers) ٠

2. الاوبيرونات البكترية Bacterial Operons

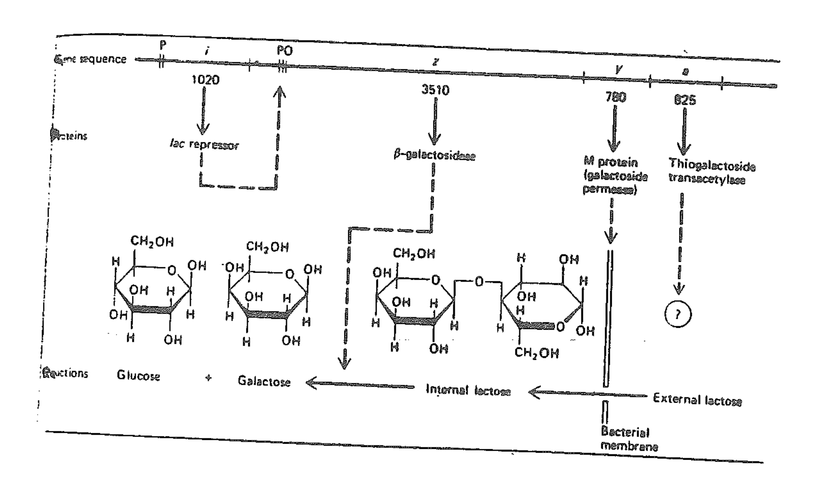
يتألف الاوبيرون البكتيري من أثنين أو أكثر من الجينات المميزة اذ غالبا ما تتخذ هذه الجينات شكلا عنقوديا كما تتأثر هذه الجينات بالطفرات والتغييرات الوراثية بصورة مستقلة ، أي أن حصول طفرة ما في احدها لا يؤثر في الجينات الاخرى المشتركة في تكوين الابيرون ٠ وكذلك تسيطر هذه الجينات على بروتينات مختلفة تقوم بوظيفة واحدة ، حيث يكون التعبير عن الابيرونات البكترية خاضعا للتنظيم الخلوي ٠ وتوجد منطقة عند نهاية المحث (Promotor) للاوبيرون تدعى المحدث (Operator) ، ويستطيع كل محدث ان يتفاعل مع بروتين منظم

محدد بواسطة جهة وراثية معينة اذ يكون وجود او غياب معقد المحدث ـ المنظم (Operator-Regulator) العامل المحدد لنسخ (Transcription) الابيرون ، اي التعبير او عدم التعبير عنه • ولتوضيح هذه المجموعة من الصفات لنلاحظ بعض الابيرونات البكتيرية ذات الاهمية في مجال التخمرات الصناعية •
ومن ابسط الامثلة على ذلك هو اوبيرون الجالاكتوز (جال ـ اوبيرون gal operon) من بكتريا E. coli الذي تتجمع فيه مجموعة جينات تسيطر على انزيمات تحفز خطوات أيضية متعاقبة (الشكل 1.3) • اذ يكون تسلسل الجينات في الابيرون بمثابة مرآة تعكس تسلسل نواتج الجين ، اي الانزيمات التي تقوم بتكسين الجالاكتوز وتحويله الى جلوكوز -1- فوسفات و UDP ـ جلوكوز • حيث تسيطر الجينات جال ـ E وجال ـ T وجال ـ K على تخليق الانزيمات جالاكتوكينيز، وجالاكتوز -1- فوسفات يوريديل ترانسفريز ، ويوريدين داي فوسفو جالاكتوز -4- ايبيميريز على التوالي •



الشكل (1.3) • اوبيرون الجالاكتوز في E.coli (جال ـ اوبيرون)
(حيث o = المحدث ، Gal-1-p = جالاكتوز ـ 1 ـ فوسفات ، UDPGal = يوريدين ثنائي فوسفوجلوكوز ، UDPGal = يوريدين ثنائي فوسفوجالاكتوز ، Glu-1-p جلوكوز ـ 1 ـ فوسفات)

أما المثال الاخر على الاوبيرونات البكتيرية هو أوبيرون اللاكتوز (لاك - اوبيرون lac operon) في ال E. coli أيضا الذي يمثل نوعا من الاوبيرونات يختلف بدرجة كبيرة عن جال-اوبيرون · اذ أن هناك جينا واحدا فقط (الجين z) من بين الجينات الداخلة في تركيب الاوبيرون (a,y,z) يكون مسؤولا عن تخليق انزيم يشترك بصورة مباشرة في مسار أيضي كما هو موضح في الشكل (2.3) ·



الشكل (2.3) اوبيرون اللاكتوز في E. coli (لاك-اوبيرون)
(حيث : B· المحث ، o= المعدث ، i= الجين المنظم ، وتشير الارقام الى عدد ازواج القواعد النتروجينية في كل جين) ·

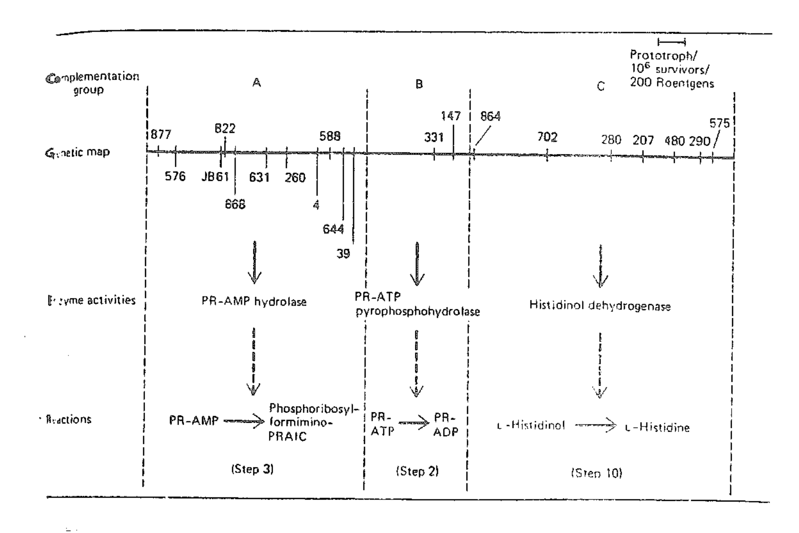
ان ناتج الجين (z) هو سلسلة ببتيدية متعددة طويلة منفردة ذات وزن جزيئي يبلغ 134000 حيث ترتبط هذه السلسلة مع ثلاث أخرى مماثلة في تركيب رباعي مكونة انزيم B- جالاكتوسيديز (ذا تركيب رباعي الجزيئات (tetramer) . ويقوم هذا الانزيم بتحفيز التحلل المائي لسكر اللاكتوز (أو أي سكر آخر من نوع B- جالاكتوسيدات) الى جلوكوز وجالاكتوز حيث يعتبر هذا التفاعل الخطوة الاساس في تخمر اللاكتوز بواسطة الاحياء المجهرية . أما ناتج الجين (y) فانـه لا يمثل انزيما ذا دور في الايض الهدمي وانما جزيئة بروتينية يطلق عليها بروتين M- أو تسمى جالاكتوسيد بيرمييز (galactoside permease) تتمركـز في غشاء الخلية البكتيرية وتعمل بصورة متخصصة على نقل اللاكتوز والجزيئـات المشابهة من الوسط الخارجي الى داخل الخليـة . ويمـد الجين (a) ، وهـو الجين الاخير في الاوبيرون ، مسؤولا عن الانزيم ثيوجالاكتوسيد ترانس أسيتيليز الذي لا تعرف له أية وظيفة داخل الخليّة لحد الان . ويلاحظ ان السلالات التي تخلـو من هذا الجين تبدي سلوكا طبيعيا في استعمال وتخمير اللاكتوز الامر الذي ولد الاعتقاد بعدم وجود دور أساس لهذا الجين في استعمال اللاكتوز والاستفادة منه .

ويلاحظ من الشكل (2.3) وجود كابح (repressor) يسيطر عليه الجين المنظم يبرز دوره عند وجود سكر سداسي (جالاكتوز أو جلوكوز) في الوسط ، الامـر الذي لا يتطلب تخليق البروتينات الاخرى التي يسيطر عليها الاوبيرون اذ ان الخلية تفضل استعمال السكر السداسي على استعمال اللاكتوز كمصدر للكربون .

الجينات العنقودية في الفطريات Clustered Heteroloci in Fungi

لقـد تركزت معظـم الدراسات على الخميرة والفطـر Neurospora حيث استهدفت تشخيص الاوبيرونات في هذه الاحياء . الا ان الملاحظ هو عدم امتلاك التراكيب العنقودية للجينات في هذه المجموعة لجميع الخواص المميزة للاوبيرون النموذج في الخلايا البروكاريوتية (بدائية النواة) procaryotie . وسنكتفي بذكر مثالين على هذه الانظمة الفطرية . المثال الاول هو his-4 Region فـي الخميرة . ان المعلومات الوراثية الموجودة في هذه المنطقة تسيطر على انتاج ثلاثة انزيمات تشترك في التخليق الحيوي للحامض الاميني هستدين اذ تسيطر هـــذه

الانزيمات على الخطوات 10,3,2 من خطوات مسار التخليق الحيوي لهذا الحامض الاميني وكما هو موضح في الشكل (3.3) ٠



الشكل (3.3) ٠ منطقة his-4 في الخميرة ٠

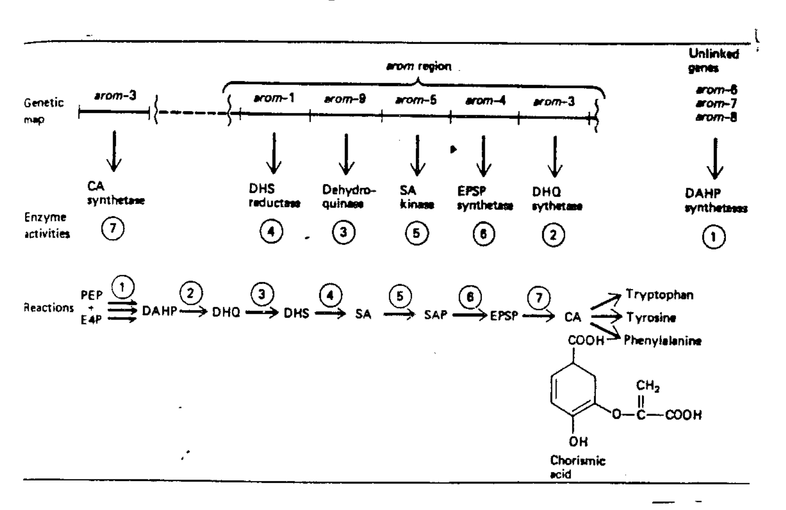
(حيث R= رايبوسيل ، P= فوسفات ، وتعبر الارقام الموجودة على الخارطة الوراثية عن الطفرات)

اذ يحفز انزيم PR- ATP هيدروليز الخطوة الثالثة في مسار التخليق ، ويحفز انزيم PR- AMP بيروفوسفوهيدروليز الخطوة الثانية ، في حين يحفز انزيم هستيدينول ديهيدروجينيز الخطوة العاشرة والاخيرة في المسار ٠ أما بقية الانزيمات التي تشترك في المسار فان السيطرة عليها تكون بواسطة جينات منتشرة على كروموسومات أخرى مختلفة ٠ وهذا يعد الفرق الاساس بين توزيع جينات الهستيدين في الخميرة وتوزيعها في بكتريا E. coli حيث تكون السيطرة على انزيمات المسار بواسطة جينات تؤلف اوبيرونا واحدا ٠

أما المثال الثاني على الجينات العنقودية فهو المنطقة الاروماتية (arom Region) في فطر Neurospora ٠ وتسيطر هذه المنطقة على خمسة انزيمات تشترك في تخليق حامض الكوريزميك Chorismic acid الذي يعد

مولدا precursor لعدد من الاحماض الامينية الاروماتية مثل التربتوفان والتيروسين والفنيل الانين وكما هو موضح في الشكل (4.3) · أما بقية الانزيمات التي تشترك في مسار تخليق حامض الكوريزميك فهي كوريزميك أسيد سينثيتيز و DAHP سينثيتيز ، فان السيطرة عليها تكون بواسطة جينات لا تقع ضمن خارطة المنطقة الاروماتية ·

وتوجد الانزيمات الخمسة التي توجه من قبل هذا العنقود الاروماتي في الخلية على هيئة متكتلة بعضها مع بعض مكونة كتلة بروتينية ذات وزن جزيئي قدره 230000 ، في حين تكون هذه الانزيمات في البكتريا بصورة خمسة بروتينات منفصلة ومستقلة بعضها عن بعض · وفي الواقع تتكون الكتلة البروتينية من كتلتين رئيستين متماثلتين حيث يبلغ الوزن الجزيئي لكل منهما 115000 وتبدي كل منهما نشاط الانزيمات الخمسة الداخلة في تركيبها ·



الشكل (4.3) المنطقة الاروماتية في الفطر Neurospora ·

(حيث PER حامض فوسفواينول بيروفيك ، E4P = ارثيروز -4- فوسفات ، DAHP = ديوكسي ارابينوهبتولوسونيك أسيدفوسفات ، DHG = حامض ديهيدروكوينيك ، DHS = حامض ديهيدرو شيكيميك ، SA = حامض شيكيميك ، SAP = فوسفات حامض شيكيميك ، EPSP = فوسفات حامض اينول بيروفيل شيكيميك ، CA = حامض كوريزميك) ·

4. السيطرة على التعبير عن الجينات في الاحياء المجهرية

تتسم السيطرة على التعبير عن الجينات وتنظيمه في الاحياء المجهرية بسمات تميزها عن تلك الملاحظة في الحيوانات والنباتات . فان كائنا حيا مجهريا مثل E. coli يبدو كروموسومه في حالة تكرار Replication مستمرة والذي يمكن ان تستغرق دورة حياته عشرين دقيقة يتبع أساليب في السيطرة والتنظيم الجيني تميزه عن النباتات والحيوانات . وفي هذا المجال لا بد من استعراض السمات العامة لتنظيم الجينات أولا .

1.4. السمات العامة لتنظيم الجينات :

من الممكن وضع فروقات اساسية بين الجينات التي يخضع التعبير عنها للتنظيم والجينات التي لا يخضع التعبير عنها للتنظيم . ويطلق على الاخيرة اسم الجينات التكوينية Constitutive Genes والتي يتم التعبير عنها بصورة مستمرة بحيث تكون نواتجها (انزيمات عادة) موجودة بصورة مستمرة وثابتة في الخلية وبنفس التراكيز تقريبا بغض النظر عن ظروف النمو وسواء كانت مواد تفاعل تلك الانزيمات موجودة أو غير موجودة في الوسط . اما الجينات القابلة للتنظيم Regulated Genes فان التعبير عنها يتعرض الى تحوير بفعل المؤثرات الكيمياوية التي تظهر وتختفي من بيئة الجين . وينبغي هنا تأكيد أن هذا التعريف للجين التكويني لا يعني بأي حال من الاحوال عدم خضوع هذا النوع من الجينات الى التنظيم والسيطرة الخلويين . وفي هذا المجال لا بد ان نذكر اهم مستويات السيطرة التي تبديها الخلية على التعبير عن جميع أنواع الجينات (ويضمنها الجينات التكوينية) والتي تتلخص فيما يلي :

(1) تركيب المحث Promotor Structure قد يؤثر تركيب المحث في تكرار بدء النسخ transcription لجين معين بواسطة RNA- بوليميريز معتمد على الـ DNA . وبواسطة هذا المستوى من السيطرة تستطيع الخلية التحكم بمقدار منتوج الجين الموجودة في الخلية .

(2) تركيب نسخة الجين Structure of Genés Transcript يحدد تركيب تركيب الجين المنسوخ الى درجة كبيرة سرعة تكسير الرسالة message الوراثية

بواسطة انزيمات الرايبونيوكلييز بعد انتهاء النسخ ٠

(3) اشارة البدء Start Signal قد يؤثر تسلسل القواعد المرتبط مع اشارة البدء AUG في نسخة جين ما في سهولة وسرعة بدء ترجمة Translation تلك النسخة ٠

ولعل الفارق الاكثر دقة بين الجينات التكوينية والجينات القابلة للتنظيم يكمن في كون عوامل السيطرة على التعبير عن الاولى محددة وغير قابلة للتغيير ، في حين تكون تلك العوامل قابلة للتحوير والتغيير في النوع الثاني ٠ وأخيرا فانه بالامكان تحديد اي الانزيمات في بكتريا E.coli يخلق تكوينيا وأيها يخلق بنـــاء على حاجة الخلية ٠ وبصورة عامة تشمل الانزيمات التكوينية constitutive enzymes تلك الانزيمات التي تحتاجها الخلية بصفة دائمة ومستمرة ٠ وعليه فان الانزيمات التي تشترك في أيض الجلوكوز كانزيمات التحلل الجلايكولي ومسار احادي فوسفات الهكسوز تعد من الانزيمـــات التكوينية ٠ وفي المقابــل فــان ايض السكريات الاقل شيوعا من الجلوكوز كاللاكتوز والارابينوز والجالاكتوز يتم بفعل الانزيمات القابلة للتنظيم (regulated enzymes) ، اذ يصبح اقتصاديا لهذه البكتريا ان تخلق وتطلق مثل هذه الانزيمات فحسب في الحالات التي تتواجد فيها مواد تفاعلها في الوسط ٠ كذلك تقوم الجينات القابلة للتنظيم بتحديد انزيمـــات مسارات التخليق الحيـــوي كمســـارات تخليـــق الاحمـــاض الامينية والبيورينات والبريميدينات وغيرها ، حيث تخلق مثل هذه الانزيمات في حالة وجود حاجـــة لنواتجها التخليقية ٠

2.4. الخواص العامة للجينات القابلة للتنظيم :

بصورة عامة هناك نوعان من الاساليب تتبعهما الخلية لحصر التعبير عـــن الجينات القابلة للتنظيم في مناسبات معينة ٠ ويمكن ان تبدي الخلية سيطرتها على مستوى النسخ نظرا لان الجين لا ينسخ الا في حالة كون الظروف مناسبة لذلك ٠ كما يمكن للخلية ان تبدي السيطرة على مستوى الترجمة اذ لا تتم ترجمة الحامض النووي الرسولي (mRNA) الناتج عن الجين القابل للتنظيم الى بروتين ما لم ترتبط بعض العوامل الرايبوسومية بالرايبوسومات المسؤولة عن التخليـــق بتاثير بعض

المؤثرات البيئية ۰ أما في حالة تنظيم نسخ الجين فان السيطرة تتم بفعل بروتينات موجودة في الكروموسوم بصورة قريبة جدا من الجينات التي تسيطر عليها ۰ ويمكن تصنيف هذه البروتينات الى صنفين الاول هو المحث promotor والثاني هـــو المحدث operator ۰ وكما ذكرنا آنفا فان الجزيئة ذات الدور الاساس في عملية التنظيم هي البروتين المنظم Regulator Protein الذي تمتلك القدرة علـى الارتباط بصورة متخصصة مع منطقة محدث أو محث معينة ۰ ولكون هذا الارتباط يستهدف تنظيم نسخ الجين فان هناك ضرورة لوجود عامل اضافي يتحكم في حدوث الارتباط يعرف باسم جزيئة المؤثر Effector Molecule ۰ ومن المعروف حاليا ان المؤثر هو جزيئة صغيرة (سكر أو حامض اميني أو نيوكليوتيد) ۰ وعلـــى العموم هناك خمسة عناصر اساسية في التنظيم الوراثي في البكتريا تتلخص فيما يلي :ـ

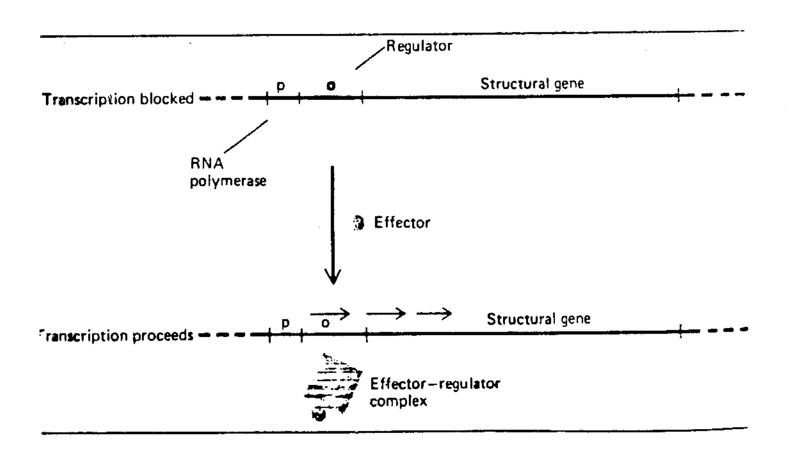
(1) الجين التركيبي القابل للتنظيم أو عنقود الجين (كما في حالة الاوبيرونات)

(2) المحدث ۰

(3) المحث ۰

(4) البروتين المنظم والجين المنظم الذي يتحكم به ، حيث يرتبط البروتين المنظم مع المحدث ويثبط التعبير عن الاوبيرون ما دام المؤثر Effector غائبا عـــن الوسط ۰ أما في حالة ظهور جزيئة المؤثر في الوسط فانها سرعان ما ترتبط مــع المنظــم « صاحبة » أياه وبالتالي تفسح المجال أمــام التعبير عــن الاوبيرون لكــي يأخذ مساره وكما هو موضح في الشكل (5.3) ۰

(5) جزيئة المؤثر Effector ۰



الشكل (5.3) · العلاقة بين المحث (P) والمحدث (O) والجين التركيبي القابل للتنظيم

وكما ذكرنا آنفا فان ست ثلاثة بروتينات تشترك في عملية استعمال سكر اللاكتوز من قبل الاحياء المجهرية ، حيث تتحكم في هذه البروتينات ثلاثة جينات تركيبية تؤلف مجتمعة لاك-أوبيرون · وتتفاوت الاحياء المجهرية في قرتها على استعمال اللاكتوز بدرجة كبيرة حتى على مستوى السلالات · فلقد وجد Mahoney وآخرون (1975) عند دراسة 49 سلالة من خميرة **Kluyveromyces fragilis** ان هذه السلالات اظهرت فروقات كبيرة في قدرتها على التخليق الحيوي لانزيم اللاكتيز (B- جالاكتوسيديز) وكما هو مبين في الجدول (1.3) -

الجدول (1.3)

التخليق الحيوي لانزيم اللاكتوز بواسطة سلالات من *Kluyveromyces fragilis* *

بيئة النمو		خميرة لكل لتر بيئة	النشاط لكل ملجم وزن جاف	الناتج الكلي لكل لتر من البيئة
Yeast strain		Yeast per liter of medium	Activity per mg dry weight	Total yield per liter of medium
(UCD #)[b]	(NRRL #)[c]	(g)	(lactose units)	(lactose units X 10^{-3})
55-31	Y-1196	5.121	2.45	12.5
C21	......	5.313	2.30	12.2
72-297	......	4.984	2.37	11.8
55-61	Y-1109	4.325	2.46	10.7
55-25	Y-1159	3.870	2.45	9.48
55-63	Y-1156	5.004	1.79	8.96
55-59	Y-1207	3.449	2.36	8.66
55-35	Y-1160	4.328	1.87	8.09
55-3	Y-108	3.742	2.08	7.78
55-38	Y-1208	3.819	2.03	7.75
55-62	Y-1137	4.933	1.55	7.65
55-29	Y-1183	4.424	1.40	6.19
55-52	Y-1163	4.476	1.22	5.46
55-22	Y-1151	3.501	1.51	5.29
55-57	Y-1195	4.067	1.20	4.88
55-2	Y-88	3.963	1.23	4.87
55-6	Y-610	3.947	1.12	4.42
55-13	Y-1012	3.753	1.17	4.39
72-5	......	5.421	.786	4.26
55-9	Y-872	4.318	.973	4.20
55-32	Y-1204	4.368	.945	4.13
55-16	Y-1122	4.992	.805	4.02
50-16	......	3.058	1.21	3.70
50-18	......	4.189	.814	3.41
55-27	Y-1177	3.576	.946	3.38
55-36	Y-1200	3.150	1.07	3.37
55-20	Y-1149	3.584	.853	3.06
55-55	Y-1176	3.817	.786	3.00
C-106	......	3.774	.781	2.95
55-66	Y-1198	3.918	.728	2.85
55-56	Y-1182	6.140	.464	2.85
55-1	......	4.405	.645	2.84
55-19	Y-1131	3.953	.705	2.79
55-4	Y-176	2.964	.914	2.71
55-30	Y-1189	2.697	1.00	2.70
50-84	......	3.645	.736	2.68
50-29	......	6.004	.202	1.21
55-12	Y-908	3.462	.340	1.18
55-7	Y-653	6.031	.099	.997
55-5	Y-208	1.864	.241	.449
55-26	Y-1172	4.578	.039	.179

* نميت خلايا الخميرة لغاية بدء الطور الثابت على 10% لاكتوز فضلا عن المغذيات التدعيمية (supplementary nutrients) في دوارق مرجوجة .

كما لاحظوا ان زيادة استخدام الشرش كوسط للنمو اعطى زيادة في كمية اللاكتيز الكلي مقدارها 30% وزيادة مقدارها 80% في نشاط اللاكتيز لكل ملغم خميرة مقارنة ببيئة اللاكتوز كما هو مبين في الجدول (2.3) . ولم تظهر فروقات كبيرة بين البيئة المبسترة Pasteurized والبيئة المعقمة بالبخار Autoclaved .

سلالة الخميرة Growth medium	خميرة لكل لتر بيئة Yeast per liter of medium (g)	النشاط لكل ملغم وزن جاف Activity per mg dry weight (lactase units)	الناتج الكلي لكل لتر من البيئة Total yield per liter of medium (lactase units $\times 10^{-3}$)
(a) 15% lactose plus "supplementary nutrients,"[b] *autoclaved*	3.82 ± .17 (3)[c]	2.83 ± .16 (3)	11.7 ± .53 (3)
(b) Whey (15% lactose) plus "supplementary nutrients," *pasteurized*	3.03 ± .18 (10)	5.13 ± .47 (10)	15.3 ± 1.3 (10)
(c) Whey (15% lactose) plus "supplementary nutrients," *autoclaved*	2.83	5.15	14.6
(d) Whey (15% lactose) plus "supplementary nutrients" *centrifuged* (pasteurized)	3.73 (2)	4.97 (2)	18.3 (2)
(e) Whey (15% lactose) plus "supplementary nutrients," *except yeast extract* (pasteurized)	3.31	4.95	16.4
(f) Whey (15% lactose) plus "supplementary nutrients," with .5% *corn-steep liquor* (CSL) added instead of yeast extract (pasteurized)			
CSL from American Maize Products Co.	3.16	5.01	15.8
CSL from Clinton Corn Processing Co.	2.80	4.78	13.4
CSL from Penick and Ford Ltd.	2.68	4.80	12.9
CSL from Staley Manufacturing Co.	2.68	4.51	12.1

a نميت الخميرة K. fragilis UCD = 55-61 في دوارق مرجوجة .

b تضمنت المغذيات التدعيمية : 0.3% K_2HPO_4 ، 0.5% مستخلص خميرة و 3% (بالحجم) $5N\text{-}NH_4OH$.

c تشير الارقام بين الاقواس الى عدد مرات القياس للحصول على النتيجة وفي حالة عدم وجودها فان التقدير كان لمرة واحدة فحسب .

الفصل الخامس

تطبيقات الوراثة الجديدة

Applications of the New Genetics

1. مقدمة
2. التجمع الوراثي في صناعة التخمر
3. تضخيم أو تكبير الجين
4. DNA ذو التشكيلات الجينية المختلفة
5. التطبيقات الاخرى للتقنية الحيوية

1. مقـــدمة Introduction

ان الهدف الاولي والرئيسي للمختص في الميكروبيولوجي الصناعي هو ايجاد كائن حي مجهري يكون انتاجه من المنتوج المرغوب غير منتظم تماما ٠ ويمكن ايجاد مثل هذه الاحياء بواسطة غربلة مجموعات المزارع الميكروبية أو العزلات المعزولة من الطبيعة ٠ وحالما يتم اختيار الكائن الحي المجهري ذي المواصفات المرغوبة ، يقوم المختص بالميكروبيولوجي بتحديد احتياجات هذا الكائن الفيزياوية والتغذوية للوصول الى أفضل نمو وانتاجية ٠ وعند هذه النقطة فان الميكانيكيات المنظمة المتضمنة : الحث ، وتنظيم التغذية الاسترجاعية ، وتنظيم مواد الايض الهدمي ينبغي استثمارها أو تجنبها من خلال المعالجات التي تشمل التغذية والهندسة والوراثة ٠ وبكلمـــة أخـــرى ينبغي تغييـــر تنظيم السلالة المختـــارة من الناحيتين البيئية والوراثية أو بكلتيهما ٠ وبعد هذه العملية من تغيير التنظيم . يمكن انتـــاج المنتـــوج التقليدي للصناعة التخمرية بأسلوب أقتصادي ٠

وقد تم توضيح قيمة وفائدة الاحياء المجهرية بقوانين علم الميكروبيولوجي التطبيقي التي وضعها العالم Perlman في الثمانينات والتي تتلخص في الاتي :ـ

(1) تكون الاحياء المجهرية دائما على صواب وهي صديقة لنا وشريكة حساسة ٠

(2) لا توجد احياء مجهرية حمقاء ٠

(3) يمكن للاحياء المجهرية ان تعمل اي شيء ٠

(4) تعد الاحياء المجهرية أكثر ذكاء وحكمة ونشاطا من الكيمياويين والمهندسين وغيرهم ٠

(5) اذا امكننا العناية باصدقائنا من الاحياء المجهـــرية ورعايتها فانهـــا بدورها ستعتني بمستقبلنا وترعاه ٠

وأخيرا ، فان التطورات الجـــذرية في الـــوراثة الجزيئية تقـــوم بدفـــع حقـــل الميكروبيولوجي الصناعي الى طور نمو جديد مع تعهد بحل معضلات العـــــالم الرئيسة ٠

2. التجمع الوراثي في صناعة التخمر

Recombination in the fermentation Industry

يمكن للاحياء المجهرية ان تولد صفات وراثية بوسيلتين هما :

التطفر Mutation والتجمع الوراثي الجنسي Sexual Recmbination ٠

ففي حالة الطفرات ، يتم تحوير جين ما أما بطريقة غير متعمدة (طفـرة تلقائية Spontaneous mutation) أو بطريقة متعمدة (طفـرة محـدثة صناعيا Induced muation) ٠ وعلي الرغم من كون التغير ضارا بصورة دائمة ويتخلص منه بواسطة الانتخاب ، غير أن بعض الطفرات تكون مفيدة للكائن الحي المجهري ٠ كما تعد بعض الطفرات الضارة ذات فائدة للميكروبيولوجيين الصناعيين الذين يتعرفون علي الطفرة بواسطة الغربلة ومن ثم حفظها لفترة غير محدودة ٠ ولم تساهم ظاهرة التجمع الوراثي Genetic recombination بشكل جوهري في الميكروبيولوجي الصناعي بسبب ندرة حدوث التجمع الوراثي في الاحياء المجهرية الصناعية ٠ وعلي سبيل المثال عادة ما يكون تكرر حدوث تجمع الصفات الوراثية في الستربتومييسيتات streptomycetes بحدود 10^{-6} أو أقل ٠

ان أحياء التخصر مثل الاكتينوميسيتات actinomycetes التي تم تجاهلها لسنوات عديدة في الدراسات الوراثية الاساسية قد دخلت في الاونة الاخيرة تحت الفحص الدقيق ٠ وقد عملت الكثير من الدراسات حول الاسلوب الجديد لاندماج البروتوبلاست الذي يتوسطه البولي اثيلين جلايكول ، والذي يزيد من تكـرار حدوث تجمع الصفات الوراثية (لغاية 10^{-2} الى 10^{-1} في الستربتوميسيتات) ويبسط من أتساع التجمع الوراثي وبالتالي تشجيع الصناعة لتخصيص وقت أكثـر للطريقة الثانية المتعلقة بزيادة التنوع الوراثي ٠

وقد استخدم اندماج البروتوبلاست Protoplast fusion لاول مرة مع الخلايا الحيوانية والخلايا النباتية وفيما بعد مع الفطريات والبكتريا الوحيـدة الخلية ، وأخيرا مع الاكتينوميسيتات ٠ وبالرغم من عدم امكانية الحصول على الافراد ذوات التشكيلات الجينية المختلفة Recombinants ثابتة وقابلة للحياة بواسطة اندماج أو امتزاج انواع غير متشابهة ، فان اندماج البروتوبلاست البينوعي الناجح وكذلك التجمع الوراثي قد تم انجـازه بين **Penicillium chrysogenum** و **P.cyaneo-fulvum** وكذلك بين **Aspergillus nidulans** و **A.rugulosus** ، وبين أنواع مختلفة من الستربتوميسيتات وحتى بين أجناس الخمائر مثل **Candida** و **Endomycopsis** ٠

وقد يزداد هذا الاتساع لمجال التجمع الوراثي الى مدى أبعد بواسطة ما تم التوصل اليه حديثا من أن تعريض بروتوبلاست الـ Streptomyces للاشعة فوق البنفسجية قبل الاندماج يدعم اختياريا تجديد الافراد ذوات التشكيلات الجينية المختلفة ، كما يمكنها زيادة تكرارية حدوث التجمع الوراثي بعد الاندماج بحوالي عشرة أضعاف ٠

ويعرض اندماج البروتوبلاست فرصة لتحسين السلالات الصناعية التي غالبا ما تتراكم فيها اضرار أثناء خطوات التطفر mutagensis في برامج تحسين السلالة ٠ وقد يحدث تجمع وراثي ضمن النوع الواحد لمثل هذه السلالات الضعيفة مع سلالات نشيطة ضعيفة الانتاج ، ومن .ه الافراد ذوات التشكيلات الجينية المختلفة والتي تعطي نوعا من الثبات قد ي تخاب سلالة قوية مفرطة في الانتاج ٠ وقد أوضحت الدراسات على سلالات من Cephalosporium acremonium نجاحا في استعمال ظاهرة التجمع الوراثي أثناء تحسين السلالة ٠

ويمكن استخدام ظاهرة التجمع الوراثي باستراتيجية أخرى في برامج تحسين السلالة ٠ اذ بدلا من انتخاب أفضل كائن حي منتج فحسب من بين الكائنات الباقية على قيد الحياة بعد المعاملة التطفرية واهمال الكائنات المنتجة المحسنة الاخرى ، فان الطفرات التي تزيد من الانتاج يمكنها أن تتجمع وراثيا للحصول على كائن منتج متفوق بدون اي تطفر أضافي ٠ وقد أثبت ذلك حديثا مع Nocardia lactamdurans اذ تم دمج سلالتين محسنتين منتجتان للسيفاميسين Cephamycin ، ومن بين الافراد ذوات التشكيلات الجينية المختلفة كانت هناك مزارع تنتج المضاد الحيوي بنسبة قد تصل الى 10-15% أعلى من النسبة التي تنتجها أفضل الخلايا الابوية ٠

ويمكن ان تنتج مضادات حيوية جديدة من اندماج كائنين ينتجان مضادات حيوية مختلفة أو حتى نفس المضادات الحيوية ٠ فاندماج نوعين من الـ Streptomyces يعطي أفرادا ذات تشكيلات جينية مختلفة تنتج المضاد الحيوي انثراسيكلين Anthracyclin الجديد ٠ وفي الاونة الاخيرة تم الحصول على ثلاثة ريناميسينات Rifamycins جديدة لم تشاهد سابقا في برامج التطفر من اندماج أنساب متباعدة

غير المكون للطفرات من برنامج تطوير سلالة انتاج المضاد الحيوي ريفاميسين ٠

3. تضخيم او تكبير الجين Gene Amplification

تعد البلاسميدات plasmids قطعا من الـ DNA الكروموسومي الاضافي وتحمل ما بين 2-250 جينا يمكن ان تتواجد بشكل مستقل في سايتوبلازم الخلية او أن تندمج في الكروموسوم ٠ وعندما تكون البلاسميدات موجودة في الحالة المستقلة فانها عادة تتولد بمعدل مماثل أو أعلى قليلا من المعدل الذي تتولد به الكروموسومات ٠ وبالرغم من أن البلاسميدات تتواجد اعتياديا بمعدل 1-30 نسخة لكل خلية ، فانها قد تجبر كي تتولد بدرجة اسرع من الـ DNA الكروموسومي ، منتجة أكثر من 3000 نسخة من الجين البلاسميدي لكل خلية ٠ وقد استثمر هذا التكنيك الخاص بتضخيم الجين بكثرة في البكتريا مثل **Escherichia coli** ٠ واصبح من الممكن الان نقل اي جين كروموسومي (أو مجموعة من الجينات) في **E. coli** الى البلاسميد لتضخيم الجين وبالتالي زيادة الجرعة الجينية وتكوين الانزيمات الى مستويات عالية جدا ٠ ويمكن نقل بلاسميد بكتريا **Bacillus** من خلية الى أخرى بواسطة ظاهرة التحول Transformation في وجود بولي اثيلين جلايكول ٠ كما يمكن نقل بلاسميدات معينة من بكتريا **Pseudomonas** (تدعى المختلطة أو غير المتجانسة Promiscuous) الى أجناس أخرى سالبة للجرام مثل **Escherichia** و **Salmonella** ، **Klebsiella** و **Rhizobium** ، **Agrobacterium** و **Acinetobacter** و **Proteus** ٠ وفي الواقع تستطيع هذه البلاسميدات ادخال عملية جنسية الى بكتريا لم يسبق ان كان لها نظام تجمع وراثي عام وجينات كروموسومية متحركة ، وتعد مفيدة جدا في الخارطة الوراثية ٠ ويمكن ان تتحول البلاسميدات من بكتريا **Staphylococcus aureus** الى خلايا بكتريا **Bacillus subtilis** حيث تتكرر أو تتضاعف وتعبر عن نفسها لتصبح طبق الاصل ٠ وحتى الكائنات الحية حقيقية النواة Eucaryotes مثل الخميرة تحتوي على ما يقارب 50 جزيئة بلاسميدية لكل خلية ٠

وقد تم كشف DNA بلاسميدي في جميع الانواع المنتجة للمضادات الحيوية

ووجد انه يحتوي اما على جينات تركيبية structural genes أو على جينات تنظم التعبير عن الجينات التركيبية العائدة للتخليق الحيوي للمضادات الحيوية ٠ وكذلك يمكن استخدام الفيروسات البكتيرية في نقل الجين وتضخيمه ٠ ان النجاح الذي تحقق مع البلاسميدات أو الفاج Phage يمكن أن يخفض بشكل ملحوظ من كلفة المضادات الحيوية فضلا عن كلفة تطوير مضاد حيوي جديد ٠

ان العمليات الجديدة لانتاج الاحماض الامينية والنيوكليوتيدات والفيتامينات يمكن أن تنشأ من تقنية تضخيم الجين ٠ كما أن العديد من الانزيمات المنظمة لشفرة الجينات التركيبية والخاصة بالتخليق الحيوي للمواد الايضية الاولية تكون متجمعة على كروموسومات البكتريا ٠ وان نقل هذه الاوبيرونات Operons الى الـDNA البلاسميدي أو الى الفاج ، والتي يتبعها عملية تضخيم ، يمكنها اعطاء عمليات جديدة مؤثرة ٠ ومن أحد الامثلة هو استخدام ظاهرة التحول المنقول أو العابر Transduction في الفاج أو ما يسمى lambda-transducing phage حيث يتم فيه دمج اوبيرون التربتوفان (trp-operon) العائد الى E.coli الموجود عادة على الكروموسوم ٠ وينتج عن تضخيم الفاج الافراط في انتاج انزيمات التخليق الحيوي للتربتوفان الى درجة معينة بحيث تشكل 50% من البروتين الذائب للخلية ٠ والامثلة الاخرى على تضخيم جينات trp-operon قد أجريت من خلال تضخيم البلاسميد ٠ والمحاولات جارية أيضا لتطوير عمليات لانتاج البرولين والبيوتين والرايبوفلافين من بين غيرها من المركبات ٠ ففي الصناعة التخمرية ، يمكن انتاج بعض الانزيمات مثل جلوكوز ايسوميريز بشكل أكثر فاعلية بواسطة تضخيم البلاسميد ٠ ويمكن ان يفضي تضخيم الجين المسئول عن شفرة انزيم بنسلين اسيليز Pencillin acylase ، وهو عبارة عن ناتج من بكتريا E.coli المستخدم في تكوين بنسيلينات شبه مخلقة ، الى عملية اقتصادية كبيرة جدا فيما يتعلق بهذا الانزيم المهم ٠

4. DNA ذو التشكيلات الجينية المختلفة Recombinant DNA

ان من أكثر الانجازات المعلنة من تقنية الـ DNA ذي التشكيلات الجينية المختلفة (الـ DNA الجديد) سيكون له أثر عظيم في الميكروبيولوجي الصناعي

خلال العقد القادم من القرن الحالي • وتعد ظاهرة اعادة تجمع الصفات الوراثيه طريقة لزيادة تنوع أو أختلاف الاحياء المجهرية ، فهي تجتذب معا المعلومات الوراثية لتكوين اتحادات أو تراكيب ثابتة جديدة وبالتالي نشوء تركيب جيني أو وراثي جديد genotype • وفي الطبيعة يحدث التجمع الوراثي بين الاحياء من نفس النوع او من أنواع متقاربة جدا • ولجميع الاحياء انزيمات تعرف باسم الاندونيوكلييزات القيدية restriction endonucleases وهذه الانزيمات تميز ال DNA الغريب وتهدمه بحيث لا يحدث ما يسمى « بالتجمع الوراثي الشاذ «illegitimate reeombination» » •

وقد اكتشف في عام 1973 انه بالامكان :

(1) استخدام الانزيمات القيدية restricted enzymes لقطع جزيئات ال DNA •

(2) استخدام انزيم آخر (DNA لايجيز) لربط قطع ال DNA •

(3) اعادة ادخال الDNAذي التشكيلات الجينية المختلفة الى E.coli مع استخدام البلاسميد كموجه أو ناقل Vector •

وتضمنت التجارب المبدئية التجمع الوراثي لبلاسميدين مختلفين وجدا في بكتريا E.coli • وبعد ذلك بوقت قصير تم احداث تجمع وراثي للجينات البلاسميدية من انواع بكتيرية غير متقاربة وذلك في انبوبة اختبار • وقد اثبت في عام 1976 ان جزءا من DNA الخميرة ، وهي من الاحياء الحقيقية النواة procayote ، يمكن ان يعبر عن نفسه ويصبح نسخة طبق الاصل عندما يدخل في كروموسوم البكتريا وهي من الاحياء البدائية النواة eucaryote • وفي نفس السنة تم زرع جين جلوبين الارنب في E.coli بواسطة مجاميع متعددة من الباحثين • وفي عام 1977 تم زرع جين انسولين الفأر وتم تحقيق التعبير عن DNA هرمون نمو الفأر وكذلك DNA سوماتوستاتين الانسان (human somatostatin DNA) • كما أن انتاج اوفالبيومين الدجاج وانسولين الفأر في بكتريا E.coli تم اثباته في عام 1978 • وانتج في عام 1979 هرمون نمو الانسان وانسولين الانسان • ويستخدم هرمون نمو الانسان في معالجة القزامة dwarfism في الاطفال ، ويصل انتاجه بواسطة تقنية DNA ذي التشكيلات

الجينية المختلفة الى حوالي 20 ملغم/لتر الذي يكافيء 1% من البروتين الـذائب لسلالة E.coli سبق هندستها أو توجيهها وراثيا ، أو 100000 جزيئة/خلية ٠ ويتشابه الناتج في التركيب والنقاوة والفعالية مع مادة الغدة النخامية ٠ وبالرغم من أن الانسولين يشكل ما يقارب 140 مليون دولار سنويا من المبيعات في الولايات المتحدة لوحدها الا أنه اليوم لا يوجد مصدر تجاري للانسولين البشري ٠ فالمصابون بمرض السكري diabetics غالبا ما يتعاطون انسولين الخنازير أو المواشي ٠ ولا يعتمد تجهيز الانسولين على تيسر الغدد الحيوانية فحسب والذي يتحصـل عليه من المجازر ولكن هناك مريض واحد في الاقل من بين 20 مريضا يكون حساسا للانسولين الحيواني ٠ وقد جرت محاولات لانتـاج انسولين بشري خـلال عامي 1982-1983 من سلالة E. coli مهندسة وراثيا ٠

وفي عـام 1980 تـم توضيح عمليـة انتـاج بروتين الانترفيرون البشري human interferon protein بواسطة E.coli من خلال تقنيـة DNA ذي التشكيلات الجينية المختلفة ٠ ان الاحياء الراقية تنتج الانترفيرون اعتياديا وبكميات ضئيلة استجابة للاصابة الفيروسية ٠ تنعكس ندرة هذا البروتين في سعره ، فقد دفعت جمعية السرطان الامريكية في عام 1978 حوالي مليوني دولار ثمنا لـ 50 مليغراما من الانترفيرون المنتج من جمع الدم في فنلندا ٠ ان مثل هذا السعر المانع قد حدد بشدة اختبار قابليته وكفاءته في معالجة الامراض الفيروسية والحـالات المختلفة من السرطان ٠ وينبغي أن يكون الانترفيرون في القريب متيسرا بسـعر أوطأ كثيرا لاغراض البحث الطبي والتقييم ٠

وعلى الرغم من حقيقة أفتقار الانترفيرون الى كربوهيدرات المادة الطبيعية ، يعد الانترفيرون المهندس وراثيا نشطا من الناحية البيولوجية اذ يقاوم بشدة الاصابة الفيروسية في القرود رغم ان درجة فعاليته لم تذكر بعد في الابحاث ٠

وبالتاكيد سيكون انتاج اللقـاح (فاكسين Vaccine) حصـيلة التقنيـة الجديدة ٠ ويمكن تخليق مستضدات البروتين protein antigens هذه بواسطة الزرع واعطاء الشفرة للجينات المعبرة من أجل البروتينات السطحية للفيروسـات والبكتريا والطفيليات ٠ والتقدم الجاري حاليا هو نحو تطوير لقاحات التهاب الكبد (hepatitis B) والانفلونزا وكذلك في المجال الزراعي ، كما ان اللقاحـات

لامراض القدم والفم وحيضة الخنازير hog cholera ستؤدي زيادات في الانتاجية الحيوانية . وتتضمن المنتجات المستقبلية المهمة وذات الفائدة الكبيرة للميكروبات المهندسة (الموجهة) engineered microbes : الحرير ، وانزيم يوروكينيز urokinase ، والكازين ورنين العجل ، والانزيمات المشتركة في تخثر الدم والنظام المتمم Complement system والجينات الفعالة او نواتج الجين (البروتينات) لعلاج الامراض الوراثية مثل الناعور hemophilia (الهيموفيليا هي نزف الدم الوراثي) .

وينبغي على تنقية DNA ذي التشكيلات الجينية المختلفة ان تنتج بروتينات ثديية mammalian proteins أكثر نقاوة بالمقارنة مع التقنيات الاخرى . وعلى سبيل المثال ، فانها تتجنب المشاكل الاعتيادية للتلوث مع الهرمونات الببتيدية المتعددة ، والبيومين المصل وبروتينات المصل الاخرى وكذلك الفيروسات المصاحبة لزراعة النسيج وطرق استخلاص النسيج او الدم . كما يجب ان تكون اكثر اقتصادية من التخليق العضوي . ومع ذلك تبقى هناك حاجة ملحة لفصل النواتج عن المستضدات الميكروبية والببتيدات المتعددة والسموم الداخلية .

ويمكن للـ DNA ذي التشكيلات الجينية المختلفة أن يقدم مساهمات الى نواتج التخمر التقليدية . وعلى سبيل المثال ان نقل الجينات المسؤولة عن شفرة اميليز الفطر Aspergillus ، أو جلوكوأميليز الفطر Aspergillus أو Rhizopus ، او جلوكوز ايسوميريز الـ Sterptomyces ، او رنين الـ Mucor الى البكتريا النامية بسرعة يمكن ان يؤدي الى عمليات انزيمية اقتصادية . ويتضمن العمل الجاري في المراكز البحثية المختلفة نقل جينات ∝ - اميليز وجلوكو اميليز وجلوكوز ايسوميريز الى كائن مستقل منتج للفركتوز ، وكذلك استخدام جينات الاميليز والجلوكوأميليز الى خميرة Saccharomyces cerevisiae للسماح بانتاج الكحول من النشا ، وكذلك استخدام الجينات المسئولة عن تكوين الانزيمات التجارية الثابتة تجاه الحرارة وأقصى حدود لـ pH الى بعض البكتريا العصوية bacilli .

ان حقل المضادات الحيوية والاوبيرونات المنتجة للمضادات الحيوية ينبغي ان يتحول من الستربتوميسيتات او الفطريات البطيئة النمو الى البكتريا الحقيقية السريعة النمو (مثل E.coli و B.subtilis) لاحراز نمو سريع وانتاج

مضادات حيويةاكثر قابلية على التكرار · تتلخص الميزات الاخرى للتقنية الجديدة في الاتي : ــ

(1) امتصاص اكثر سرعة للمغذيات بسبب عظم او كبر نسبة السطح الى الحجم ·

(2) نقل اوكسجين افضل نظرا لان الاحياء الخيطية تنتج سوائل غير نيوتونيــة لزجة ·

(3) عملية خلط او مزج احسن وبالتالي سيطرة اكثر تعويلا على الـــ pH وتركيزات الاوكسجين وثاني اوكسيد الكربون ·

(4) افضل كائن حي من اجل عملية التطفر ·

والامكانية الاخرى هي نقل مثل هذه الاوبيرونات من احدى الستربتوميسيتات الى الاخرى على أن تكون الجينات التركيبية اكثر قدرة على التعبير عن نفسها فـي الانواع الميكروبية الاخرى · وعلى سبيل المثال ، قد ينتج أمينوجلوكوسيد مكتشف حديثا عند مستويات واطئة جدا كأن تكون 10 ميكروغرام/مل ، وان برنامـــج تحسين السلالة التقليدي قد يستغرق سنوات لزيادة الكمية المنتجة الى وضع معقول من الناحية الاقتصادية ألا وهو 10 مليغرام/مل · لذلك فان نقل الجينات التركيبية الى مفرط في انتاج المضاد الحيوي كناميسين Kanamycin الذي يمتلك فعليا ميكانيكيات مقاومة للمضادات الحيوية الامينوجلوكوسيدية ، قد يعطي زيادة كبيرة في الكمية المنتجة من المضاد الحيوي · وقد تبدو هذه الامكانات غير واقعية خاصة اذا كانت الجينات المسئولة عن انزيم انتيبيوتك سينثيتيز قد انتشرت حول الخارطة الوراثية للاكتينوميسيت ، ولكن لحسن الحظ انها لا تظهر على مثل هذا الحال · وقد أظهرت الدراسات في الاونة الاخيرة تجمع جينات التخليق الحيوي التركيبية للمضـاد الحيوي اكتينورهودين actinorhodin وشبيه البروديجيوسين الاحمـــر red prodigiosine ــ Like في الكائن المجهري Streptomyces coelicolor

وكذلك للمضاد الحيوي اوكسيتتراسيكلين oxytetracyclin في S.rimosus

وايضا للمضاد الحيوي ريفاميسين rifamycin في Nocardia mediterranei

وعليــه يصبح من الممكن ادخال اوبيرونات التخليــق الحيــوي الكروموسومية من الاكتينوميسيتات في البلاسميدات أو الفاج ونقلها الى E.coli أو اية اكتينوميسيتات أخرى · وتتطلب العملية الاخيرة طرائق تقنية وموجهات الاكتينوميسيتات التي يمكن

بواسطتها ادخال الـ DNA الهجين الى داخل خلايا الاكتينوميسيتات ٠

وفضلا عن استخدام التخليق الحيوي الطفري واندماج البروتوبلاست لانتاج المضادات الحيوية ، فان طرق نقل البلاسميد والـ DNA ذي التشكيلات الجينية المختلفة يمكن ان تستخدم لاستقدام الجينات المسئولة عن شفرة انزيمات انتي‌بيوتك سينثيتيزات الى الاحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية الاخرى أو الى السلالات غير المنتجة ٠ وتشمل الامكانات الاخرى استقدام الجينات المسئولة عن شفرة الانزيمات المحفزة لاضافة أو حذف وظائف كيمياوية معينة وكذلك الانزيمات المحفزة لتكوين وربط سلاسل جانبية جديدة أو اجزاء جديدة (كالسكريات) ٠

ان لطرائق الـ DNA ذي التشكيلات الجينية المختلفة أثرا كبيرا في انتاج البروتين في الوقت الحاضر ٠ اذ تم تحسين حصيلة بروتين الخلية الواحدة Single Cell Protein من الميثانول بواسطة استقدام الجين المسئول عن انزيم جلوتامات ديهيدروجينيز الى الكائن الحي المجهري **Methylophilus** **methylotrophs** وهذا الانزيم ، على خلاف جلوتامين سينثيتيز ، لا يبدد شيئا من ادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) أثناء تمثيل الامونيا ٠

ونظرا لان التلوث والطاقة قد اصبحتا من اكثر المضلات خطورة وجدية ، عليه ستكون هناك حاجة ملحة لاحلال العمليات الانزيمية محل العمليات الكيمياوية كما هو الحال في الانتاج الانزيمي لاوكسيدات الالكين alkene oxides والفركتوز ٠ كما توجد فرص لتطوير عمليات انزيمية جديدة بغرض هدم السليلوز والهيميسليلوز واللجنين الى سكريات ومواد كيمياوية أخرى ٠ وبالرغم من ان بحوثا عديدة جديرة بالاعتبار قد اجريت عن انزيمات السليلوليزات والهيميسليلوليزات ، الا ان هناك حاجة لعمل اختراق حقيقي في حقل تهديم اللجنين ٠ والذي يمكن تخيله هو انتاج الانزيمات المحللة للجنين بواسطة طرائق الـDNA ذي التشكيلات الجينية المختلفة الذي يمكن ان يحل معضلة تحويل هذا البوليمر الواسع الانتشار والمزعج الى مصدر للمواد الكيمياوية الاروماتية ٠

ومن اهم الاحياء المجهرية المفيدة للانتاج المستقبلي للوقود السائل والمواد الكيمياوية من المصادر النباتية ، الكلوستريديا clostridia ٠ والكلوستريديات

كمجموعة تكون قادرة على انتاج الايثانول وحامض اللاكتيك وحامض الخليك والاسيتون والبيوتانول • ونظرا لعدم تمكن معظم هذه السلالات من النمو على السليلوز او الهيميسليلوز ، فمن المفيد والممتع أن تكون هناك مقدرة على نقل الجينات المسئولة عن شفرة انزيمات السليلوليز والهيميسليلوليز من **Clostridium thermocellum** على سبيل المثال الى كلوستريديات أخرى • ومن المعروف ان الهيميسليلوز يتألف من وحدات البنتوز ، لذلك من المناسب نقل صفة تمثيل البنتوز بين الكلوستريديات • وتعرض درجة الحرارة العالية المثلى (65° الى 75 °م) لبعض الكلوستريديات المحبة للحرارة العالية themophilic clostridia فرصة لخفض كلفة تقطير الايثانول والمذيبات الاخرى وجعل هذه العمليات أكثر اقتصادية •

5. التطبيقات الاخرى للتقنية الحيوية

Other Applications of Biotechnology

قادت ظاهرة التجمع الوراثي في الاحياء الراقية الى تطور رئيسي في حقل علم المناعة Immunology • اذ قام الباحثان Kohler و Milstein في عام 1975 بدمج خلية سرطانية من جلد الفار (ورم نقيي أو لبي myeloma) مع خلية بيضاء منتجة للضد (جسم مضاد antibody) وحصلا على خلية هجين (hybridoma) التي نمت في انبوبة اختبار واعطت مضادا نوعيا نقيا •

ولم يسبق انتاج مثل هذه المضادات النقية (monoclonal) ، عندما كان الاعتماد على المخاليط غير النقية للمضادات العائدة لمصل الحيوان المنيع في توفير الحماية المناعيــة تجــاه الامراض • وفي الوقت الحاضر تعــد المضــادات المعــروفة باسم Monoclonal antibodies متيسرة تجاريا للابحاث والاستخدامات التشخيصية والعلاجية •

وقد درست تقنية الخلية بشكل واسع على أمل جعل المواد الايضية النباتية والحيوانية على نمط مماثل لذلك المستخدم في التخمر الصناعي • وقد عملت بعض المواد الايضية النباتية المسماة Plant idiolites بواسطة المزارع الخلوية النباتية وعدد من التحولات الحيوية ، بيد ان التقنية لم تصبح بعد معقولة من الناحية التجارية لذلك يتطلب الامر زيادة المعرفة الاساسية فيما يتعلق بالميكانيكيات المسئولة

عن اثارة الايض الثانوي في النباتات • فقد تم انتاج الانترفيرون البشري والبروتينات الثدوية الاخرى بواسطة المزارع الخلوية الحيوانية النامية على خرزات ميكروسكوبية (حوامل دقيقة microcarrriers) • وتسمح مثل هذه المزارع بنمو المزارع الخلوية المعتمدة على وجود مواد تثبيت في مزرعة مغمورة وليس على السطوح الزجاجية لاطباق بتري أو الزجاجات الاسطوانية • والمحاولات جارية الان لجعل مزارع العامل الدقيق microcarrier cultures معقولة من الناحية التجارية •

والتقدم الزراعي الرئيس الذي يمكن الوصول اليه عن طريق علم الحياة الجديد هو استبدال الاسمدة التركيبية بواسطة طريقة محسنة لتثبيت النتروجين nitrogen fixation • ولم يلق الامل في ادخال الجينات المسئولة عن تثبيت النتروجين في خلايا النباتات غير البقولية نجاحا كبيرا في هذا المجال ، بيد ان الامكانات والاحتمالات الاخرى ما زالت قائمة • ومن المقتربات التي صادفت النجاح والتقدم هو انشاء علاقة تآزرية او تعاونية synergistic relation بين البكتريا المثبتة للنتروجين الحرة المعيشة وبين النباتات غير البقولية (مثل الذرة) • وفي هذه الطريقة تقوم سلالات من Azotobacter vinelandii المفرزة للامونيا بتجهيز نتروجين مثبت الى النباتات ، في حين تقوم النباتات بتوفير الكربون الى البكتريا •

والمقترب الجديد الاخر في الحقل الصيدلاني هو استعمال مواد الايض الثانوي الميكروبية لمعالجة الامراض غير المسببة بواسطة البكتريا والفطريات الاخرى• فقد استخدمت لسنوات عديدة عقاقير رئيسة مثل عامل مفرط الضغط وعامل ضد الالتهاب في معالجة الامراض غير المعدية (غير الخمجية noninfectious) والتي تعد منتجات تخليقية على نحو تام • وبصورة مماثلة فان المواد العلاجية الرئيسة تجاه الامراض الطفيلية في الحيوانات (مثل موقفات الكرويات cocidiostats وطاردات الديدان antihelminthics) قد انتجت بواسطة غربلة المركبات المختلفة كيمياويا ثم اعقبتها عملية تحوير جزيئية • وعلى الرغم من اختبار الالاف من المركبات ، فقد كشف النقاب عن عدد قليل فحسب من التراكيب الموجودة التي ينتظر لها مستقبل كبير • ونظرا لصعوبة ايجاد مركبات

رائدة جديدة ، فان السوائل الميكروبية تقوم بملء هذا الفراغ · وبالفعل فـأن منتجات التخمر مثل Monensin و Lasalocid تسود سوق موقفات الكرويات coccidiostat · وتمتلك الافرميستينات Avermectins وهي مجموعة اخرى من منتجات الستربتوميسيت فعالية عالية تجاه الديدان (Helminths) والمفصليات (Arthropods) · وفي الحقيقة تبدو فعاليتها على درجـة من القـوة والعظـم اكبر من تلك العوامل الطاردة للديدان المكتشفة سابقا ، وتعد الغالبية العظمـى منها مركبات مختلفة · وقد عزلت مجموعة الباحث Umezawa في اليابان عـام 1972 نواتج ميكروبية عديدة لها فعاليات صيدلانية مهمة عـن طريـق عمليات الغربلة باستخدام طرق تحليل انزيمية بسيطة ·

وهناك اهتمام جار فيما يتعلق بالاختبار السريري للـ BAYg 5421 **(Acrabose)** وهو مثبط طبيعي لانزيم الجلوكوسيديز المعوي الذي ينتج بواسطة أحـد الاكتينوميسيتات العائدة للجنس Actimoplanes · والغرض من ذلك هو خفض فرط سكرية الدم hyperglycemia وتخليق الجليسريدات الثلاثية في الانسجة الشحمية والكبـد والجـدار المعـوي للمرضى الذين يعـانون من أمـراض السكري **Diabetes** والسمنة **Obesity** ونوع **IV** مـن فـرط الشحميـة Type IV hyperlipidemia · والمركب الطبيعي الاخر المثير للاهتمام هـو ميفينولين Mevinolin الذي يعد منتوجا فطريا ويعمل كعامل خافض للكوليستيرول في الحيوانات · وينتج الميفينولين بواسطة الفطر **Aspergillus niger** · ان الميفينولين في صورته الحامضية (حامض ميفينولينيك mevinolinic acid) يعد مثبطا تنافسيا فعالا تجاه 3 ـ هيدروكسي ـ 3 ـ مثيل جلوتاريل ـ كوانزيم A ريداكتيز من الكبد ·

مراجع الباب الرابع

Alikhanian, S.I. (1962) - Iduced mutagensis in the selection of microorganisms. Adv. Appl. Microbiol.,4, 1-50.

Bhattacharjee, J.K. (1970) - Microorganisms as potential sources of food. Adv. Appl. Microbiol., 13, 139-161.

Bu' Lock, J.D. (1961) - Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Adv. Appl. Microbiol., 3, 293-342.

Bu'Lock, J.D. (1965 a)-The biosynthesis of natural products. McGraw-HillBook Co., London.

Bu'Lock, J.D. (1965 b) - In'' Biogensis of antibiotic substances,,. (Z. Venck and Z. Hostalek, eds.) pp. 61-71. Academic Press, New York.

Bu'Lock, J.D. (1975) - In'' The filamentous fungi'' (J.E.Smith and D.R.Berry, eds.). Vol.1, pp. 33-58. Edward Arnold, London.

Calam, C. T. (1964) - The selection, improvement and preservation of microorganisms. Prog. Ind. Microbiol., 5, 1-54.

Demain, A.L. (1966) - Industrial fermentations and their relation to regulatory mechanisms. Adv. Appl. Microbiol., 8,1-27.

Dmain, A.L. (1968) - Progress. Ind. Microbiol., 8, 35.

Demain, A.L.(1968) - Lloydia, 31, 395.

Demain, A.L. (1972) - J. Appl. Chem. and Biotech., 22, 345.

Demain, A.L. (1973) - Mutation and the production of secondary metabolites. Adv. Appl. Microbiol., 16, 177-202.

Demain, A.L. (1974)-Annuals of the New York Academy of Sciences, 235, 601.

Demain, A.L. (1978)-Production of nucleosides by microorganisms. In "Economic microbiology, Vol.2, primary products of metabolism ". (A.H.Rose, ed.) pp. 187-208. Academic Press, London.

Demain, A.L. (1980) - Search, 11, 148.

Demain, A.L. (1980 - Microbial production of primary metabolites. Naturwissenschaften, 67, 582-587.

Demain, A.L. (1981) - Industrial microbiology. Science, 214, 987-995.

Demain, A.L., Daniels, H.J., Schnable, L., and White, R.F. (1968) - Nature, London 220, 1324.

Demain, A.L., and White, R.F. (1971) - J. Bacteriol., 107, 456.

Drake, J.W. (1969) - Mutagenic mechanisms. Ann. Rev. Genetics, 3, 247-268.

Drake, J.W. (1970) - Molecular basis of mutation. Holden Day, San Francisco.

Drews, S.W., and Demain, A.L. (1977) - Ann. Rev. Microbiol., 31, 343.

Elander, R.P., and Chang, L.T. (1979) - In "Microbial technology". (H.J. Peppler and D. Perlman, eds.) Academic Press, New york.

Gordenough, U., and Levine, R.P. (1974) - Genetics Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.

Hays, W. (1968) - The genetic of bacteria and their viruses, 2nd ed. John wiley & Sons, Inc., New york.

Kinoshita, S., and Nakayama, K. (1978) - Amino acids. In

''Economic microbiology, Vol.2, Primary products of metabolism'' (A.H.Rose, ed.) Academic Press, London.

Kinoshita, S., Nakayama, K., and Kitada, S. (1968) - L - Lysine production using microbiol auxotroph. J.Gen. Appl. Microbiol., 4, 128-129.

Kinoshita,S., Udaka, S., and Shimono, M. (1957) - J. Gen. Appl. Microbiol. 3, 193.

Kohler, G., and Milstein, C. (1975) - Nature (London), 256, 495.

Konigsberger, V.V., and Bosch, L. (1967) - Regulation of nucleic acid and protein biosynthesis. Elsevier, Amsterdam.

Lederberg, J., and Lederberg,E.M. (1952) - Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.J.Bacteriol., 63, 399-406.

Legator, M.S., and Flamen, W.G. (1973) - Environmental mutagensis and repair. Ann. Rev. Biochem., 42, 683-708.

MacDonald, K.D. (1976) - Second international symposium on the genetic of industrial microorganisms. Academic Press, New York.

Mahoney, R.R., Nikerson, T.A., and Whitaker, J.R. (1975) - Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of Lactose from **Kluyveromyces fragilis.** J,Dairy Sci., 58, 1620-1629.

Margalith, P. (1964) - Secondary factors in fermentation processes. Adv.Appl. Microbiol., 6 69-90.

Martin, J.F., and Demain, A.L. (1980) - Microbiol. Rev., 44, 230.

Miller, B.M., and Litsky, W. (1976) - Industrial microbiology.McGraw-Hill Book Co., New york.

Orgel, L.E. (1965)-The chemical basis for mutation. Adv. Enzymol., 27, 289-346.

Peppler, H.J., and perlman, D. (1979) - Microbial technology,2nd ed. Vol.1. Microbial processes.Academic Press,London.

Peppler, H.J., and Perlman, D. (1979) - Microbial technology,2nd ed. Vol.2. Fermentation technology. Academic Press, London.

Perlman, D. (1978) - Vitamins. In''Economic microbiology, Vol.2, Primary prouducts of metabolims''. (A.H. Rose, ed.) pp. 303-326. Academic press, London.

Perlman, D. (1980) - Dev. Ind. Microbiol., 21, XV.

Perlman, D., and Peruzzotti, P. (1970) - Microbial metabolities as potentially useful pharmacological active agents. Adv. Appl. Microbiol., 12, 277-294.

Rhodes, A., and Fletcher, D.L. (1966) - Principles of industrial microbiology, 1st ed. Pergamon Press Oxford.

Rose, A.H. (1976) - Chemical microbiology: an introduction to microbial physiology, 3rd ed. Butterworths, London.

Rose, A.H. (1978) - Economic microbiology, Vol. 2. Primary products of metabolism. Academic press, London.

Rose, A.H. (1979) - Economic microbiology, Vol.4.Microbial biomass. Academic press, London.

Rose, A.H. (1980) - Economic microbiology, Vol.5. microbial enzymes and bioconversions. Academic press, London.

Shu,P., and Johnson, M.J. (1948) - J. Bacteriol., 56, 577.

Stanier, R.Y., Adelberg, E.A., and Ingraham, J. (1976) - The microbial world. Prentice - Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

Susman, M. (1970) - General bacterial genetics. Ann.Rev.Gene-tics, 4, 135-176.

Taylor, M.J., and Richardson, T. (1979) - Applications of mi-crobial enzyme in food systems and in biotechnology. Adv. Appl. Microbiol., 25, 7-36.

Thoma, R.W. (1977) - Industrial microbiology. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, Pennsylvania.

Umezawa, H. (1972) - Enzyme inhibitors of microbial origin. University Park Press, Baltimore.

Vanck, Z., Hotalek, Z., and Cudlin, J. (1973) - Genetics of industrial microorganisms. Elsevier, Emsterdam.

Wingard, L.B. Jr., Katchalski Katzir, E., and Goldstein, L. (1976) - Applied biochemistry and bioengineering, Vol.1. Immobilized enzymes principles. Academic Press, London.

Wingard, L.B.Jr., Katchalski Katzir, E., and Goldstein, Vol.2.Enzyme technology. Academic Press, London.

Witkin, E.M. (1969) - Ultraviolet - induced mutation and DNA repair. Ann. Rev. Genetics, 3, 525-552.



معجم المصطلحات العلمية

A

Absorbance	أمتصاص ضوئي
Absorptivity	أمتصاصية
Acceptor	مستقبل
Acetaldehyde	استيالدهيد
Acetate	استيات ، خلات
Acetic acid	حامض الخليك
Acetic acid bacteria	بكتريا حامض الخليك
Acetoacetic acid	حامض أسيتواسيتيك
Acetoacetyl-Co A	أسيتوأسيتيك كوأ
Acetobacter	أسيتو باكتر
Acetoin	أسيتوين
Acetone	اسيتون
Acetone-butanol fermentation	تخمر الاسيتون البيوتانول
Acetyl-Co A	أسيتيل كوأ
Acetylmethylcarbinol	أسيتيل مثيل كربينول
Acid	حامض
Acidity	حموضة
Acidulants	مواد تحميض (محمضات)
Aconitase	اكونيتيز
Aconitate	أكونيتات
Aconitic acid	حامض اكونيتيك

Acridine	آكريدين
Actinorhodin	اكتينوهودين
Activated sludge	الوحل المنشط
Activation	تنشيط
Activators	منشطات
Active sites	المواضع النشطة او الفعالة
Acyl - Co A	أسيل كوأ
Adaptation	اقلمة ، تطبيع
Adaptive enzyme	انزيمات تطبعية
Adenine	أدينين
Adinosine diphosphaet (ADP)	أدينين ثنائي الفوسفات
Adenosine monophosphate (AMP)	ادينوسين احادي الفوسفات
Adenosine triphosphate (ATP)	أدينوسين ثلاثي الفوسفات
Adenylic acid	حامض ادينيليك
Adsorbent	مادة ماصة
Adsorption chromatography	التحليل الكروماتوجرافي بالامتزاز
Aerated fermentor	مخمر مهوّى
Aeration	تهوية
Aerobic	هوائي
Agar	اجار
Agar slant	اجار مائل
Agar stab	اجار عميق
Agitated fermentor	مخمر مرجوج
Agitation	رج ، تقليب
Air sparger	مرشة هواء
Alanine	الانين
Alcohol	كحول

Alcohol dehydrogenase	كحول ديهيدروجينيز
Alcoholic beverages	مشروبات كحولية
Alcoholic fermentations	تخمرات كحولية
Alcoholometer	مكثاف (مقياس) الكحول
Aldehydes	الدهيدات
Aldolase	الدوليز
Algae	طحالب
Alginate	الجينات
Alkali	قلوي
Alkaloids	قلويدات
Alkylating agents	عوامل الكلة
Allosteric inhibitor	مثبط آلوستيري
Amino acids	احماض امينية
Aminocy clase	أمينو سيكليز
Aminopeptidase	أمينو بيبتيديز
Ammonia	أمونيا
Ammonium salts	املاح الامونيوم
Amphibolic pathway	مسار الايض المزدوج
Amylases	اميليزات
Amyloglucosidase	اميلوجلوكوسيديز
Amylopectin	اميلوبكتين
Amylose	أميلوز
Anabolism	أيض بنائي
Anabolites	مواد الايض النبائي
anaerobic	لاهوائي
Anaerobic fermentation	تخمر لاهوائي
Anaerobic glycolysis	تحلل جلايكولي لاهوائي
Anaerobic metablism	ايض لاهوائي

Anaerobiosis	تعايش لاهوائي
Anaplerotic reactions	تفاعلات مالئة
Anthra cyclin	انثر اسيكلين
Anion exchanger	مبادل انيوني
Antibiotics	مضادات حيوية
Antibody	ضدّ (جسم مضاد)
Antifoam agents	مضادات الرغوة
Antigens	مستضدات
antihelminthics	طاردات الديدان
Antioxidants	مضادات الاكسدة
Apiculate	ذات شكل ليموني (مدببة الطرف)
Aplanospores	سبورات غير متحركة
Arabinose	ارابينوز
Arginine	ارجينين
Aquatic fungi	فطريات مائية
Arthrospores	سبورات مفصلية
Ascocarp	ثمرة كيسية
Ascorbic acid	حامض الاسكوربيك
Ascospores	سبورات كيسية (زقية)
Ascus	كيس (زق)
Asepsis	طهارة
Aseptic techniques	طرق مطهرة (طاهرة)
Asparagine	اسباراجين
Aspartic acid	حامض الاسبارتيك
Assay	تحليل
Assimilation	تمثيل
Atomizer	مرذاذة ، مجزئ
aureomycin	اوريوميسين

Autoclave	اوتوكلاف
Autolysis	تحلل ذاتي
Autotrophic microbes	ميكروبات ذاتية التغذية
Autotrophs	ذاتيات التغذية
Auxotrophic microbes	ميكروبات ذات قدرة تخليقية ناقصة
Auxotrophic mutants	طفرات ذات قدرة تخليقية ناقصة
Auxotrophs	احياء ذات قدرة تخليقية ناقصة
Avermectins	أفرميستينات

B

Bacilli	عصويات (بكتريا عصوية)
Bacitracin	باسترامين
Back mutation	تطفر رجعي
Bacteria	بكتريا
Bacterial enzymes	انزيمات بكتيرية
Bacterial mutation	طفرة بكتيرية
Bactericide	مبيد البكتريا
Bacteriostatic	موقف نمو البكتريا
Baffles	مصدات (مانعات التداخل)
Baker's yeast	خميرة الخباز
Balling hydrometer	هيدروميتر (مكثاف)بالنج
Ballistospores	سبورات بالستية
Basidiospores	سبورات بازيدية
Basidium	بازيدة
Batch culture	مزرعة الوجبة (الدفعة) الواحدة
Batch fermentation	تخمر الوجبة (الدفعة) الواحدة
Bed volume	حجم طبقة المادة المالئة
Beer	بيرة

Beer's law	قانون بيير
Beet molasses	مولاس البنجر
Benzoquinone	بنزوكينون
Benzyl penicillin	بنزيل بنسلين
ß-galactosidaase	ß ـ جالاكتوسيديز
ß-galactosides	ß ـ جالاكتوسيد
Bidirectional mutagenesis	تطفر ثنائي الاتجاه
Biliproteins	بيليبروتينات
Binaray fission	انشطار ثنائي
Binding agent	مادة رابطة
Biochemical changes	تغيرات كيموحيوية
Biochemical mutations	طفرات كيموحيوية
Biochemical oxygen demand (BOD)	الاحتياج للاوكسجين الكيموحيوي
Biochemistry	كيمياء حيوية
Bioconversions	تحولات حيوية
Biological assays	طرق التحليل البيولوجية
Biological systesm	نظام بيولوجي
Biological waste treatment	معاملة المخلفات بيولوجياً
Biosynthesis	تخليق حيوي
Biotechnology	تقنية حيوية
Biotin	بيوتين
Bisexual	ثنائي الجنس
Bisulfite	بيكبريتيت
Blendor	خلّاط
Blue-green algae	الطحالب الخضر الزرق
Boiler	مرجل بخاري
Bottom fermenting yeast	خميرة التخمر القاعي
Brewer's yeast	خميرة البيرة
Brewing	صناعة البيرة
Brix values	قيم بركس

Broth	مرق
Brown sulfur bacteria	بكتريا الكبريت البنية
Bud fission	انشطار البرعم
Budding	تبرعم
Buffer	بفر (منظم)
2,3 - Butanediol	3,2 — بيوتانديول
2,3-Butylene glycol	3,2 — بيوتيلين جلايكول
n-Butanol	n — بيوتانول
Butyric acid	حامض البيوتيريك
Butyric acid bacteria	بكتريا حامض البيوتيريك
By-products.	نواتج ثانوية

C

Cadaverine	كادافيرين
Calcium	كالسيوم
Calcium gluconate	جلوكونات الكالسيوم
Cane molasses	مولاس القصب
Capsule	غلاف لزج
Carbohydrases	كربوهيدريزات
Carbohydrate fermentation	تخمر الكربوهيدرات
Carbohydrate	كربوهيدرات
Carbon	كربون
Carbon cycle	دورة الكربون
Carboxylase	كربوكسيليز
Carboxylation	اضافة الكربوكسيل
ß-Carotene	ß — كاروتين
Carriers	حوامل
Carotenoids	كاروتينويدات

Catabolic pathways	مسارات الأيض الهدمي
Catabolism	الأيض الهدمي
Catabolite repression	كبح مواد الأيض الهدمي
Catabolites	مواد الأيض الهدمي
Catalase	كتاليز
Catalysts	حوافز
Cathode rays	اشعة الكاثود
Cation exchanger	مبادل كاتيوني
Cellulase	سليلوليز
Cellulose	سليلوز
Cell count	عد الخلايا
Cell division	انقسام الخلية (انشطار الخلية)
Cell membrane	غشاء الخلية
Cell wall	جدار الخلية
Centrifugal force	قوة نابذة أو طاردة
Centrosome	كرية مركزية
Cephalosporins	سفالوسبورين
Cephamycin	سيفامسين
Cereal	حبوب غلال
Cereal products	منتجات الحبوب
Characteristics	سمات ، صفات
Cheese	جبن
Chemical intermediates	مواد وسطية كيمياوية
Chemically defined medium	بيئة معرّفة كمياوياً
Chemical oxygen demand (COD)	الاحتياج للاوكسجين الكيمياوي
Chemotheraputic agents	عوامل العلاج الكيمياوي
Chemotherapy	المعالجة (المداواة) الكيمياوية
Chill-haze	عكارة التبريد
Chlamydospores	سبورات كلاميدية
Chloroamines	كلورو أمينات

Chloroamphenicol	كلورو امفنيكول
Chloride	كلوريد
Chlorination	كلورة (اضافة الكلور)
Chloroform	كلوروفورم
Chloromycetin	كلوروميسيتين
Chlorophyll	كلوروفيل
Chloroplast	كلوروبلاست
Chlorotetracycline	كلوروتتراسيكلين
Cholesterol	كوليستيرول
Chromatography	التحليل الكروماتوجرافي
Chrysolaminarin	كريسولامينارين
Cis-aconitic acid	حامض ميس ــ اكونيتيك
Citrate synthase	سترات سينثيز
Citric acid	حامض الستريك
Citric acid cycle	دورة حامض الستريك
Class	صف
Classification	تقسيم ، تصنيف
Cleanliness	نظافة
Clostridia	كلوستريديات
Coagulation	تخثر
Cobalt	كوبلت
Cobamide	كوباميــد
Cocarboxylase	كوكربوكسيليز
Cocci	كرويات
Coccidiostats	موقفات الكرويات
Coenzyme A	كوانزيم أ
Coenzyme Q (ubiquinone)	كوانزيم كيو (يوبيكينون)
Coenzymes	مرافقات انزيمية
Coliform bacteria	بكتريا القولون
Collumella	عويمد

Colorimeter	جهاز تحليل اللون
Commensals	مؤاكلات
Complement system	نظام متمم
Conidia	كونيديات
Conidiophore	حامل كونيدي
Conjugation	اقتران (التحام)
Constitutive enzymes	انزيمات تكوينية
Constitutive genes	جينات تكوينية
Contamination	تلوث
Continuous fermentations	تخمرات مستمرة
Control of fermentation	السيطرة على التخمر
Cooling coils	ملفات تبريد
Cooling system	نظام تبريد
Copper	نحاس
Corn	ذرة
Corn sleep liquor	محلول نقيع الذرة
Cottonseed meal	مسحوق بذرة القطن
Counter current distribution	توزيع التيار المضاد (او المعاكس)
Creatine	كرياتين
Creatine phosphate	فوسفات الكرياتين
Crude medium	بيئة خام
Cultivation of microorganisms	حصاد (جمع) الاحياء المجهرية
Cultural characteristics	صفات مزرعية
Culture	مزرعة
Culture collections	مجموعات المزارع
Culture medium	بيئة الزرع
Culture preservation	حفظ المزرعة
Culture studies	دراسات مزرعية
Culture vessel	وعاء المزرعة
Cyanocobal amine (Vit.B_{12})	سيانوكوبال أمين

Cyanophycean starch	نشاسيانوفايكين
L - cysteine	L ـــ سستايين
L - cystine	L ـــ سستين
Cytidine	سايتدين
Cytochromes	سايتوكرومات
Cytoplasmic membrane	غشاء سايتوبلازمي
Cytosine	سايتوسين

D

Dairy products	منتجات الالبان
Deamination	ازالة الأمين
Death phase	طور الموت
Decarboxylase	دي كربوكسيليز
Decarboxylation	ازالة الكربوكسيل
Defined medium	بيئة معرّفة
Diffusion assay	التحليل بلانتشار
Dehydration	تجفيف
Dehydrogenase	ديهيدروجينيز
Denaturation	تغير الطبيعة
Density	كثافة
Deoxyribonuclease	ديوكسي رايبونيوكلييز
Deoxyribonucleic acid (DNA)	حامض ديوكسي رايبونيوكليك
Deoxyribose	ديوكسي رايبوز
Derepression	ازالة الكبح او القمع
Detection	كشف
Detector	مكتشف
Detergents	منظفات
Deterioration	فساد ، تدهور

Dextran	ديكستران
Dextrin	ديكسترين
Diabetics	مرض السكري
Diacetyl	ثنائي الاسيتيل
Diaminopimelic acid (DAP)	حامض ثنائي امينوبيميليك
DAP decarboxylase	DAP ــ دي كربوكسيليز
Differential media	بيئات تفريقية
Diffusion	انتشار
Dihydroxyacetone	ثنائي هيدروكسي اسيتون
Dihydroxyacetone phosphate	فوسفات ثنائي هيدروكسي اسيتون
Dioecious	منفصل الجنس
1,3-Diphosphoglucerate	1 و 3 ــ ثنائي فوسفوجليسرات
Dipicolinic acid	حامض ثنائي بيكولينيك
Diploid	ثنائي المجموعة الكروموسومية
Dispersion	إنتشار
Displacement	إزاحة
Distillation	تقطير
Distilled beverages	مشروبات مقطرة
Distribution ratio	نسبة التوزيع
Disulfide	ثنائي الكبريتيد
Divergent lines	انساب متباعدة
Division	قسم
Donor	مانح
Dormancy of spores	سكون السبورات
Dry ice	ثلج جاف
Dry heat	حرارة جافة
Drying	تجفيف
Drugs	عقاقير ، ادوية
Dual fermentation	تخمرات مزدوجة
Dwarfism	قزامة

E

Ebulliometer	جهاز قياس الكحول
Ecology	علم البيئة
Economics	اقتصاد
Edible oils	زيوت الطعام
Effector molecule	جزيئة المؤثر
Effluent	السائل المتدفق
Electrodes	الكترودات (الاقطاب)
Electron acceptors	مستقبلات الالكترون
Electron transport	نقل الالكترون
Electron transport chain	سلسلة نقل الالكترون
Eluate	السائل المسترد
Elution	استرداد
Elution volume	حجم الاسترداد
Embden-Meyerhof Parnas Pathway (EMP)	مسار امبدن مايرهوف بارناس
Endocellular enzymes	انزيمات خلوية داخلية
Endoenzymes	انزيمات داخلية
Endospores	سبورات داخلية
Endotoxins	سموم داخلية
End-point determination	تقدير (تحديد) نقطة النهاية
End-product inhibition	تثبيط الناتج النهائي
End-product repression	كبح الناتج النهائي
Endergonic reaction	تفاعل ماص للطاقة
Energy	طاقة
Energy coupling	ازدواج الطاقة
Energy rich comopunds	مركبات غنية بالطاقة
Energy source	مصدر الطاقة
Energy yielding metabolism	ايض منتج للطاقة
Enginered microbes	ميكروبات مهندسة (أو موجهة)

Enriched media	بيئة معززة (مغناة)
Enrichment	تعزيز ، اغناء
Enrichment culture	مزرعة الاغناء
Entner-Doudoroff Pathway (DEDP)	مسار انتردودوروف
Enzymatic assays	طرق التحليل الانزيمية
Enzyme action	نشاط الانزيم (فعل الانزيم)
Enzyme formation	تكوين الانزيم
Enzyme induction	حث الانزيم
Enzyme purification	تنقية الانزيم
Enzyme reaction	تفاعل الانزيم
Enzyme repression	كبح الانزيم
Enzyme substrate complex	معقد انزيم ــ مادة التفاعل
Enzymes	انزيمات
Environment	ظروف بيئية
Equilibrium	اتزان
Ergot	ايرجوت
Erythromycin	اريثروميسين
Essential nutrients	مغذيات رئيسية (اساسية)
Essential oils	زيوت عطرية
Esters	استرات
Ethane	ايثان
Ethanol	ايثانول
Ethyl alcohol	كحول الايثايل
Eucaryota	حقيقة النواة
Eucaryotic organisms	احياء حقيقية النواة
Evaporation	تبخير
Exclusion chromatography	كروماتوجرافي الرفض او الاقصاء
Exergonic reaction	تفاعل مطلق للطاقة
Exocellular enzymes	انزيمات خلوية خارجية
Ezoenzymes	انزيمات خارجية

Exotoxins	سموم خارجية
Exponentisl phase	طور النمو الاسي (اللوغارتيمي)
Extinction	انقضاء
Extracallular	خارج الخلية
Extraction	استخلاص

F

Facultative anaerobes	لاهوائيات اختيار
Facultative autotrophs	ذاتيات التغذية اختيار
False	كاذب
Family	عائلة
Fastidious	صعبة الارضاء (المتطلبات)
Fat	دهن
Fat production	انتاج الدهن
Fatty acids	احماض دهنية
Feedback inhibition	تثبيط التغذية الرجعية (الاسترجاعية)
Feed yeasts	خميرة علفية
Fermentation	تخمر
Fermented food	اغذية مخمرة
Fermented milk	حليب مخمر
Fermentor	مخمر
Fermentor design	تصميم المخمر
Fertile	خصب
Filamentous fungi	فطريات خيطية
Filamentous microorganisms	احياء مجهرية خيطية
Film yeasts	خميرة غشائية
Filter	مرشح
Filter press	مرشح بالضغط

Filteration	ترشيح
Fish meal	مسحوق السمك
Flagella	اسواط
Flame photometry	فوتومتري اللهب
Flavine adenine dinucleotide (FAD)	فلافين ادينين ثنائي النيوكليوتيد
Flavine mononucleotide (FMN)	فلافين ادينين احادي النيوكليوتيد
Flavoproteins	فلافوبروتينات
Flavor	نكهة
Flavoring agants	عوامل نكهة (منكهات)
Flocculation	تلبيد ، تجمع
Flourescence	وميض ، فلورة
Flourometry	التحليل بالوميض (او الفلورة)
Flow rate	معدل السريان
Foam	رغوة
Fodder yeast	خميرة علفية
Folacin	فولاسين
Folic acid	حامض الفوليك
Food presevation	حفظ الاغذية
Food yeast	خميرة غذائية
Foot cell	خلية قدمية
Formaldehyde	فورمالدهيد
Formaline	فورمالين
Form-class	صورة صف
Formc acid	حامض الفورميك
Fraction collector	جامع القطفات (الاجزاء)
Freez-drying	تجفيد
Fructose	فركتوز
Fructose-6-phosphate	فركتوز -6- فوسفات
Fucoxanthin	فوكوزانثين
Fruiting bodies	اجسام ثمرية

Fumarase	فيوماريز
Fumaric acid	حامض الفيوماريك
Function	وظيفة
Functional groups	مجاميع وظيفية
Fungal enzymes	انزيمات فطرية
Fungal protease	بروتييز فطري
Fungi	فطريات
Fungi imperfecti	فطريات ناقصة
Fungicides	مبيد الفطريات
Fusel oil	زيت كحولي (كحول عالي)

G

Galactonic acid	حامض جالاكتونيك
Galactose	جالاكتوز
Galactose-1-phosphate	جالاكتوز -1- فوسفات
Gametes	امشاج
Gamma radiation	اشعة جاما
Gas chromatography	الكروماتوجرافي الغازي
Gas adsorption chromatography	الكروماتوجرافي الغازي الامتزازي
Gas liquid chromatography	الكروماتوجرافي الغاز السائل
Gases	غازات
Gel filtration	الترشيح بالهلام
Gene amplification	تضخيم (تكبير) الجين
Genera	اجناس
Generation tine	وقت الجيل
Generic name	اسم الجنس
Genes	جينات
Genetic block	تعطيل (اعاقة) وراثي
Genetic code	شفرة وراثية

Genetic information	معلومات وراثية
Gemetic engineering	هندسة وراثية
Genetic map	خارطة وراثية
Genetic recombination	تجمع وراثي
Genetic stability	ثبات وراثي
Genetics	وراثة
Genotype	تركيب جيني او وراثي
Genus	جنس
Germicidal agents	عوامل ابادة الجراثيم
Germicides	مبيدات الجراثيم
Gibberellic acid	حامض الجبرليك
Gibberellins	جبرلينات
Gliding bacteria	البكتريا المنزلقة
Gluconic acid	حامض الجلوكونيك
Glucose	جلوكوز
Glucose fermentation	تخمر الجلوكوز
Glucose isomerase	جلوكوز آيسومريز
Glucose oxidase	جلوكوز اوكسيديز
Glucose-6-phosphate	جلوكوز -6- فوسفات
Glutamic acid	حامض الجلوتاميك
Glutamine	جلوتامين
Glutathione	جلوتاثيون
Glyceraldehyde-3-phosphate	جليسر الدهيد -3- فوسفات
Glyceric acif	حامض الجليسريك
Glycerol	جليسرول
Glycerol phosphate	فوسفات الجليسرول
Glycerolphosphate dehydrogenase	جليسرول فوسفات ديهيدروجينيز
Glycogen	جلايكوجين
Glycogen granule	حبيبة جلايكوجين
Glycolysis	تحلل جلايكولي

Glyoxylate cycle	دورة الجلايوكسيلات
Gram negative	سالبة للجرام
Gram positive	موجبة للجرام
Granules	حبيبات
Gravimetric analysis	التحليل الوزني
Griseofulvin	جريسيوفولفين
Growth assay	التحليل بقياس النمو
Growth characteristics	صفات النمو
Groowth curve	منحنى النمو
Growth factors	عوامل النمو
Growth rate	سرعة النمو
Growth stimulant	مثير او منبه النمو
Growth stimulation	اثارة او تنبيه النمو
Growth temperature	درجة حرارة النمو
Guanidine	جوانيدين
Guanilic acid	حامض جوانيليك
Guanine	جوانين
Guanosine diphosphate (GDP)	جوانوسين ثنائي الفوسفات
Guanosine monophosphate (GMP)	جوانوسين احادي الفوسفات
Guanosine triphosphate (GTP)	جوانوسين ثلاثي الفوسفات

H

Halophilic bacteria	البكتريا المحبة للملح
Haploid	احادي المجموعة الكروموسومية
Headspace	فراغ رأسي
Heat resistance	مقاومة للحرارة
Heat shocking	صدمة حرارية
Hemicellulase	هيميسليلوليز
Hemicellulose	هيميسليلوز

Hemophilia	ناعور (نزف دم وراثي)
Hetertofermentaive organisms	احياء مختلفة (غير متجانسة) التخمر
Heterogamic	خلايا مختلفة الامشاج
Heterogamic	مختلف (متغاير) الامشاج
Heterolactic fermentation	تخمر لاكتيكي مختلط (غير متجانس)
Heterothallie	متباين الثالوس
Heterotrophs	غير ذاتية التغذية
Hexokinase	هكسوكينيز
Hexose	هكسوز
Hog chorlera	هيضة الخنازير
Homofermentative organisms	احياء متجانسة التخمر
Homolactic fermentation	تخمر لاكتيكي متجانس
Homoserine	هوموسيرين
Hormones	هرمونات
Humidity	رطوبة
Hybridization	تهجين
Hyfrocarbon farentation	تخمر الهيدروكربون
Hydrogen	هيدروجين
Hydrogen sulfide	كبريتيد الهيدروجين
Hydrol	هيدرول (مولاس الذرة)
Hydrolases	هيدروليزات
Hydrolysis	تحلل مائي
Hydrometer	هيدروميتر ، مكثاف
Hydroxylation	اضافة الهيدروكسيل
Hygiene	صحة ، صحي
Hyperglycemia	فرط سكرية الدم
Hyper producer	مفرط في الانتاج
Hyper prohuction	فرط الانتاج
Hyper sensitivity	فرط الحساسية
Hyphae	هيفات

I

Identification	تشخيص
Idiophase	طور الانتاج
Illegitimate recombination	تجمع وراثي شاذ
Imbhoff tamk	حوض ايمهوف
Immobile phase	وجه غير متحرك (ثابت)
Immobile solvent	مذيب غير متحرك (ثابت)
Immobilized cells	خلايا غير طليقة (مثبتة)
Immobilized	انزيمات غير طليقة (مثبتة)
Immunology	مناعة
Impellers	دافعات
Incubation	تحضين
Indicator	دليل
Induced enzyme	انزيم محث (محدث)
Induced mutation	طفرة محثة (محدثة)
Inducing agant	عامل محث (مستحث)
Induction	احداث ، حث
Industrial fermentation	تخمر صناعي
Industrial microbiology	ميكروبيولوجي صناعي
Infection	اصابة ، عدوى
Inhbition	تثبيط
Inhibitors	مثبطات
Inoculation	تلقيح
Inoculation technique	طريقة التلقيح
Inoculum	لقاح (باديء)
Inoculum tanks	احواض اللقاح (الباديء)

Inorganic acids	احماض لاعضوية
Inosinic acid	حامض اينوسينيك
Inosine diphosphate(IDP)	اينوسين ثنائي الفوسفات
Inosine monophosphate (IMP)	اينوسين احادي الفوسفات
Inosine triphosphate (ITP)	اينوسين ثلاثي الفوسفات
Inositol	اينوسيتول
Insulin	انسولين
Interconversion	تحويل متبادل
Interferon protin	بروتين انترفيرون
Intermediary metabolism	ايض وسطي
Intermediate	مادة وسطية
Intracellular	داخل الخلية (ضمن الخلية)
Invertase	انفرتيز
Iodine	يود
Ion exchange	تبادل ايوني
Ion exchange resins	راتنجات التبادل الايوني
Iron	حديد
Isoamyl alcohol	كحول آيسوامايل
Isocitric acid	حامض آيسوستريك
Iso citric dehydrogenase	آيسوستريك ديهيدروجينيز
Isogamic	متماثل الامشاج
Isolation	عزل
Isomerization	آيسومرية
Isomers	آيسومرات
Isopropyl alcohol	كحول آيسوبروبايل
Itaconic acid	حامض ايتاكونيك

K

Kanamycins	كناميسينات
α- Keto acids	احماض α- كيتو
2- Ketogluconic acid	حامض 2 ـــ كيتوجلوكونيك
5-Ketogluconic acid	حامض 5 ـــ كيتوجلوكونيك 5
α- Ketogluaric acid	حامض αــ كيتوجلوكونيك
Ketones	كيتونات
Kinetics	حركيات
Kojic acid	حامض الكوجيك
Kerbs Cycle	دورة كربس

L

Lactate	لاكتات
Lactic acid	حامض اللاكتيك
Lactic acid bacteria	بكتريا حامض اللاكتيك
Lactic acid dehydrogenase	لاكتيك اسيد ديهيدروجينيز
Lactobacilli	لاكتوباسيلاي
Lactose	لاكتوز
Lactose utization	استغلال اللاكتوز
Lag phase	طور الركود
Lard oil	شحم الخنزير
Late nutrient addition	الاضافة المتأخرة للمغذيات
Latent heat	الحرارة الكامنة
Legume inoculant	لقاح البقول
Lichens	اشنات
Life cycle	دورة حياة
Lipases	لايبيزات

Lipids	ليبيدات
Lipolytic bacteria	البكتريا المحللة لليبيدات
Liquefaction	اسالة ، اماعة
Liquid medium	بيئة سائلة
Liquid nitrogen	نتروجين سائل
Logarithmic phase	الطور اللوغاريتمي
Lyophilization	تجفيد
Lysine	لايسين
Lysate	متحلل
Lysis	تحلل (انحلال) الخلايا
Lysogenic microorganisms	احياء مجهرية محلحلة

M

Macoomolecules	جزيئات كبيرة
Magnesium	مغنيسيوم
Maintenance	محافظة ، ادامة
Malate	مالات
Maleic acid	حامض الماليك
Malic acid	حامض الماليك
Malt	مولت (شعير منبت)
Malt extract	مستخلص المولت
Manganese	منغنيز
Mannitol	مانيتول
Manometer	مانوميتر (مقياس الضغط)
Mash	مزيج ، هريس
Measurement	قياس
Mechanical aeration	تهوية ميكانيكية
Mechanical agitaion	تقليب ميكانيكي

Media	بيئات
Mecium	بيئة
Meiosis	انقسام اختزالي (منصف)
Membrane filter	مرشح غشائي
Mercurochrome	ميركيوروكروم
Mesophiles	محبة للحرارة المعتدلة (المتوسطة)
Metabolic block	اعاقة (تعطيل) ايضية
Metabolic by-products	النواتج الثانوية الايضية
Metabolic control	سيطرة ايضية
Metabolic inhibitors	مثبطات ايضية
Metabolic intermediates	مواد وسطية ايضية
Metabolic pathways	مسارات (طرق) ايضية
Metabolic rates	معدلات ايضية
Metabolic response assay	التحليل بالاستجابة الايضية
Metabolism	ايض
Metabolites	مواد ايضية
Metals	معادن
Methane	ميثان
Methionine	مثيونين
Methyl alcohol	كحول مثيلي
Mevinolin	ميفينولين
Michaelis constant	ثابت ميكيليس
Microaerophiles	محبة لظروف قليلة الهواء
Microbe	ميكروب (كائن حي مجهري)
Microbal cells	خلايا ميكروبية
Microbial fermentations	تخمرات ميكروبية
Microbial metabolism	أيض ميكروبي
Microbial physiology	فسلجة ميكروبية
Microbial transformation	تحولات ميكروبية
Microbiological assays	طرق التحليل الميكروبيولوجية

Microcarrier	حامل دقيق
Microorganisms	احياء مجهرية
Mineral oil	زيت معدني
Mitochondria	مايتوكوندريا
Mitochrondrial membrane	غشاء المايتوكوندريا
Mitosis	انقسام اعتيادي
Mixed cultures	مزارع مختلطة
Mobile phase	وجه متحرك (غير ثابت)
Mobile solvent	مذيب متحرك
Molar absorptivity	امتصاصية جزيئية
Molasses	مولاس
Molds	اعفان
Molecular seiving	غربلة جزيئية
Molybdenym	موليبدنوم
Monochromatic	احادي الطول الموجي
Monochromator	موحد الطول الموجي (الضوء)
Monoecious	احادي المسكن
Monosodium glutamate (MSG)	جلوتامات احادي الصوديوم
Morphology	مورفولوجي (علم الشكل)
Motile	متحرك
Motor	محرك
Multi enzyme system	نظام متعدد الأنزيمات
Multi-stage	متعدد المراحل
Multiple-step fermentation	تخمر متعدد الخطوات
Municipal waste	مخلفات البلدية
Mushroom	عش الغراب (عرهون)
Mutagen	مطفر
Mutagenic agents	عوامل مطفرة
Mutagensis	تطفر
Mutant strain	سلالة طفرية

Mutants	طفرات
Mutation	طفرة
Mutational block	اعاقة (تعطيل) طفرية
Mycelial mat	حصيرة ميسيليوم
Mycelium	ميسيليوم
Mycology	علم الفطريات

N

Natural farmentations	تخمرات طبيعية
Napthoquinons	نافثوكينون
Neomycin	نيوميسين
Nephelometer	مقياس الكدر (جهاز قياس الكدر)
Newtonian fluids	سوائل نيوتونية
Niacin	نياسين
Nicotin amide-adenine dinucleotide (NAD)	نيكوتين اميد ادينين ثنائي النيوكليوتيد
Nicotin amide-adenine-dinucleotide phos-phate (NADP)	فوسفات نيكوتين ادينين ثنائي النيوكليوتيد
Nitrate	نترات
Nitrification	نترتة ، نترجة
Nirifying bacteria	بكتريا التأزت
Nitrogen	نتروجين
Nitrogen fixation	تثبيت النتروجين
Nitrogen mustard	خردل نتروجيني
Nitrogenous compunds	مركبات نتروجينية
Nitrous acid	حامض النتروز
Non-Newtonian fluids	سوائل غير نيوتونية
Novobiocin	نوفوبيوسين
Nucleic acid	حامض نيوكلييك

Nucleosides	نيوكليوسيدات
Nucleotides	نيوكليوتيدات
Nucleus	نواة
Nutrient	مغذي (مادة مغذية او غذائية)
Niutrient agar	اجار مغذي
Nutrition	تغذية
Nutritional mutations	طفرات تغذوية
Nutritional requirements	احتياجات تغذوية (غذائية)

O

Obligate	اجباري (اساسي)
Obligative anaerobes	لاهوائيات اجبار
Octadecanol	اوكتاد يكانول
Oils	زيوت
Oogonia	حافظة بيضية
Oospores	سبورات بيضية
Operating gene	الجين المحدث
Operator	المحدث
Operon	اوبيرون
Optimum temperaturs	درجة حرارة مثلى
Order	رتبة
Organic acids	احماض عضوية
Organic substances	مواد عضوية
Orthophosphate eleavage	تكسر اورثوفوسفات
Osmosis	ازموزية ، تناضح
Osmophilic	محبة للازموزية
Osmotic pressure	ضغط ازموزي
Over-producer	مفرط في الانتاج
Over-production	فرط الانتاج

Ovum	بييضة
Oxalate	اوكزالات
Oxaloacetate	اوكزالواسيتات
Oxidation	اكسدة
Oxidation ponds	برك الاكسدة
Oxidation-reduction potential	جهد الاكسدة والاختزال
Oxidative decarboxylation	ازالة الامين التأكسدية
Oxidative decarboxylation	ازالة الكربوكسيل التأكسدية
Oxidative phosphorylation	الفسفرة التأكسدية
Oxidative tranaformation	التحول التأكسدي
Oxdized	مؤكسد ، متأكسد
Oxidizing agents	عوامل الاكسدة (التأكسد)
Oxygen	اوكسجين
Oxygen absorption	امتصاص الاوكسجين
Oxytetracyalin	اوكسي تتراسيكلين

P

Paladino shaker	هزاز بالادينو
Pantothenic acid	حامض البانتوثينيك
Paper chromatography	التحليل الكروماتوجرافي الورقي
Para formaldehyde	بارافورمالدهيد
Parasites	متطفلات ، طفيليات
Partition chromatography	التحليل الكروماتوجرافي بالتجزيء او الفصل
Partition coefficient	معامل الفصل او التجزيء
Passive diffusion	انتشار سلبي
Pasteur effect	تأثير باستور
Pasteurization	بسترة
Patents	براءات اكتشاف (اختراع)

Pathogenic microorganisms	احياء مجهرية مرضية
Pathogens	ممرضات
Pectic acids	احماض البكتيك
Pectic enzymes	انزيمات بكتينية
Pectic subtances	مواد بكتينية
Pectin	بكتين
Pectinases	بكتينيزات
Pectolytic enzymes	انزيمات محللة للبكتين
Penicillin	بنسلين
Penicillin G	بنسلين G
Pentose phosphathway	مسار فوسفات البنتوز
Pentoses	بنتوزات
Pepsin	ببسين
Peptidases	ببتيديزات
Peptide bond	رابطة ببتيدية
Peptone	ببتون
Peridinin	بيريدينين
pH	اس هيدروجيني
Phage	فاج
Phenol	فينول
Phenotype	الشكل (النمط) الظاهري
Phenylaccetic acid	حامض فنيل استيك
Phialide	ذنيب
Phosphatase	فوسفاتيز
Phosphate donor	مانح الفوسفات
Phosphoarginine	فوسفو ارجينين
Phosphocreatine	فوسفوكرياتين
Phosphodiestter	فوسفو ثنائي الاستر
Phosphoenol pyruvate	فوسفو اينول بيروفات
Phosphoenol pyruvate carboxylase	فوسفو اينول بيروفات كربوكسيليز
Phosphoglucomutase	فوسفو جلوكوميوتيز

6-Phosphogluconate	6 ــ فوسفوجلوكونات
6-Phosphogluconolactone	6 ــ فوسفوجلوكونولاكتون
2-phosphoglycerate	2 ــ فوسفوجليسرات
3-Phosphoglycerate	3 ــ فوسفوجليسرات
Phosphorus	فوسفور
Phosphorylation	فسفرة
Photoelectric colorimeter	مقياس اللون الكهروضوئي
Photometer	مقياس الضوء
Photosynthesis	تخليق ضوئي
Photorophic microorganisms	احياء مجهرية ضوئية التغذية
Physiochemical assays	طرق التحليل الفيزيوكيمياوية
Pickles	مخللات
Pigment	خضاب
Piching	تلقيح
Planogametes	طحالب هائمة (بلانكتون)
Planogametes	أمشاج مسطحة
Plasmids	بلاسميدات
Plasmodium	بلاسموديوم (مصورة)
Plasmolysis	بلزمة (انكماش بروتوبلازم الخلية)
Plastids	بلاستيدات
Plate-count technique	طريقة العد بالاطباق
Polarimeter	مقياس الاستقطاب الضوئي
Polarimetry	طريقة القياس بالاستقطاب الضوئي
Pollution	تلوث
Polycondensation	تكثيف تجميعي
Polyethylene glycol	بولي اثيلين جلايكول
polymerase	بوليمريز
Polymierization	بلمرة
Polymixns	بوليميكسينات
Polynucleotides	نيوكليوتيدات متعددة

Polypeptides — ببتيدات متعددة
Polysaccharides — سكريات متعددة
Polystyrene — ستيارين متعدد
Potassium — بوتاسيوم
Pour-plate technique — طريقة الصب في الأطباق
Precursors — مولدات
Pregermination — انبات مسبق
Preservation — حفظ
Primary metabolites — مواد أيضية أولية
Primary products — نواتج أولية
Primary screening — غربلة اولية
Primary stocks — خزين اولي (أساسي)
Procaryota — بدائيات النواة
Procaryotic organisms — احياء بدائية النواة (غير حقيقية النواة)
Product inhibition — تثبيط الناتج
Production — انتاج
Products — نواتج ، منتجات
Proflavine — بروفلافين
promiscuous — مختلطة ، غير شرعية
Promotor — محث
Proof — بروف
Propionic acid bacteria — بكتريا حامض البروبيونيك
Proteases — بروتيزات
Protein antigens — مستضدات البروتين
Protein biosynthesis — التخليق الحيوي للبروتين
Proteins — بروتينات
Proteolysis — تحلل البروتين
Proteolytic bacteria — البكتريا المحللة للبروتين
Proteolytic enzymes — الانزيمات المحللة للبروتين
Protista — الاوليات

Protoplasm	بروتوبلازم
Protoplasmic membrane	غشاء بروتوبلازمي
Protoplast fusion	اندماج البروتوبلاست
Prototrophic	ذات قدرة تخليقية كاملة
Protozoa	بروتوزوا
Psychrophiles	محبة للبرودة (الحرارة المنخفضة)
Pure culture	مزرعة نقية
Purification	تنقية
Purines	بيورينات
Putrifaction	فساد تعفني
Pyconometer	قنينة الكثافة
Pyridoxal phosphate	فوسفات البيريدوكسال
Pyridoxin	بيريدوكسين
Pyimidines	بيريميدينات
Pyrophosphate cleavage	تكسر بيروفوسفات
Pyruvate	بيروفات
Pyruvic acid	حامض البيروفيك
Pyruvic acid decarboxylase	بيروفيك أسيددي كربوكسيليز
Pyruvic acid dehydrogenase	بيروفيك اسيد ديهيدروجينيز
Pyruvic acid kinase	بيروفيك أسيد كينيز

Q

Quantitative	كمي
Quality control	سيطرة نوعية
Quinine	كوينين
Quinones	كينونات

R

Racemic mixture	مخلوط راسيمي
Radiation	أشعاع ، أشعة
Raffinose	رافينوز
Ratio	نسبة ، معدل
Raw material	مادة خام
Reagent	كاشف
Reciprocating shaker	هزاز ترددي
Recombinant DNA	DNA ذو التشكيلات الجينية المختلفة
Recombinants	افراد ذو التشكيلات الجينية المختلفة
Recombination	ظاهرة التجمع الوراثي
Recorder	مسجل
Recovery	استرجاع
Reduced	مختزل
Reduction	اختزال
Reductive carboxylation	اضافة الكربوكسيل الاختزالية
Refractive index	معامل الانكسار
Refractometer	رفراكتوميتر
Refractometry	طرق القياس بأنكسار الضوء
Regeneration	تجديد
Regulate	ينظم
ulated enzyme	انزيم منظم
Regulated gene	جين منظم
Regulation	تنظيم
Regulatory enzyme	انزيم تنظيمي
Regulatory gene	جين تنظيمي
Regulatory mechanisms	ميكانيكيات منظمة
Relative front (Rf)	المسافة النسبية للهجرة
Relative solubility	ذائبية نسبية

Release factor	عامل إطلاق
Rennet	رنين
Repair mechanisms	ميكانيكيات الاصلاح او التعويض
Replacement	إحلال
Replica plating rechnique	طريقة الطبع المتكرر بالاضافة
Replication	تكرار
Repression	كبح ، قمع
Repressor	كابح ، قامع
Reproduction	تكاثر ، تناسل
Reproductive cells	خلايا تكاثرية
Research	بحث
Resin	راتنج
Resistance	مقاومة
Resolution	فصل
Respiration	تنفس
Respiratory chain	سلسلة تنفسية
Respirometer	مقياس التنفس
Resting cell	خلية مستريحة (هاجعة)
Restriction	تقييد ، تحديد
Restriction enzymes	انزيمات قيدية
Retardation growth phase	طور بطء النمو
Retention	احتفاظ
R_f-values	قيم R_f
Retroinhibition	تثبيط
Rhizoid	اشباه الجذور
Riboflavine (Vit.B_2)	رايبوفلافين
Ribonucleic acid (RNA)	حامض رايبونيوكلييك
Ribose	رايبوز
Ribose-5-phosphate	رايبوز ـــ 5 ـــ فوسفات
Ribosomes	رايبوسومات

Ribulose-5-phosphate	رايبيولوز ــ5ــ فوسفات
Rifamycin	ريفاميسين
Rontgen rays	اشعة رونتجن
Rotary shaker	هزاز دوراني
Rust	صدأ

S

Sac fungi	فطريات كيسية
Saccharification	تسكير
Saccharometer	مقياس السكر
Saccharolytic bacteria	البكتريا المحللة للسكر
Saccharophilic	محبة للسكر
Salts	املاح
Saprophytes	مترممات ، رميات
Scattered light	ضوء مشتت
Sclerotia	أجسام حجرية
Screening	غربلة
Secondary metabolites	مواد أيضية ثانوية
Secondary products	نواتج ثانوية
Secondary screening	غربلة ثانوية
Sectoring culture	مزرعة مجزأة
Secretion	إفراز
Sedimentation	ترسيب
Selection	انتخاب ، انتقاء
Selective media	بيئة انتخابية (انتقائية)
Selective ion electrodes	الكترودات ايونية انتقائية
Selenium	سيلينيوم
Sensitivity hypha	اختبارات الحساسية

Septated hyphae	هيفات مقسمة
Septic tank	حوض التعفن
Separation	فصل
Serial dilution techuique	طريقة التخفيف المتسلسل
Serine	سيرين
Sexual recombination	تجمع وراثي جنسي
Sexual reproduction	تكاثر جنسي
Sewage	مياه البالوعات
Shake-flask	الدورق المرجوج
Shake-flask fermentation	تخمر الدورق المرجوج
Shaker	هزاز
Shaking	هز ، رج ، تقليب
Silica gel	هلام السليكا (سليكاجل)
Silicone compounds	مركبات السليكون
Single cell protein (SCP)	بروتين الخلية الواحدة
Single cell technique	طريقة عزل الخلايا الفردية
Single stage	مرحلة مفردة
Slime	مادة لزجة
Slime molds	اعفان (فطريات) لزجة
Sludge	وحل
Sludge digestion	هضم الوحل
Smut	تفحم
Soil	تربة
Soluble	ذائب
Solute	مذاب
Solution	محلول
Solvent	مذيب
Sorbitol	سوربيتول
Sorbose	سوربوز

Soybean meal	مسحوق فول الصويا
Spargers	رشاش ، نافث
Species	نوع
Specific	نوعي
Specific activity	نشاط نوعي (فعالية نوعية)
Specific gravity	وزن نوعي
Spectrophotometer	مطياف
Spectrophotometric analysis	التحليل الطيفي
Spoilage	فساد
Spontaneous	ذاتي ، تلقائي
Spontaneous fermentation	تخمر ذاتي (تلقائي)
Spontaneous generation	توالد ذاتي (تلقائي)
Spontaneous mutation	طفرة تلقائية
Sporangia	حافظات سبورية
Sporangiophore	حامل سبوري
Sporangiospore	سبور حافظي
Sporangium	حافظة سبورية
Spore forming bacteria	بكتريا مكونة للسبورات
Spores	سبورات (أبواغ)
Sporulation	تبويغ
Stabilized sludge	وحل منشط
Staining	تصبيغ
Standard curve	منحني قياسي
Starch	نشا
Starter	بادىء ، لقاح
Starter culture	مزرعة البادىء
Starvation	جوع ، مجاعة
Stationary growth phase	طور النمو الثابت
Stationary phase	الوجه الثابت
Static cultures	مزارع ساكنة

Static test tubes	انابيب اختبار ساكنة
Statospores	سبورات ساكنة
Steady state	الحالة الثابتة
Steam	بخار
Steam seal	بخار تعقيم
Sterility	عقم
Sterilization	تعقيم
Steroids	ستيرويدات
Steroids transformation	تحول الستيرويدات
Stimulants	منبه ، مثير
Stimulation	تنبيه ، إثارة
Stimulatory	تنبيهي
Stinkhorns	قرون نتنة
Stock-cultures	مزارع خزين
Stolon	مداد
Storage	خزن
Strains	سلالات
Strain selection	اختيار السلالة
Streak-plate technique	طريقة التخطيط على الاجار
Streptomycin	ستربتوميسين
Strict autotrophs	ذاتية التغذية إجبار
Strict heterotrophs	غير ذاتية التغذية إجبار
Strigma	ذنيب
Strigmata	ذنيبات
Structure	تركيب ، بناء
Sub-class	تحت الصف
Sud-division	تحت القسم
Submerged culture	مزرعة مغمورة
Substrate	مادة تفاعل
Substrate level phosphorylation	فسفرة مستوى مادة التفاعل

Subtilin	سبتيلين
Succinate	سكسينات
Succinic acid	حامض السكسينيك
Succinic acid dehydrogenase	سكسينيك اسيد ديهدروجينيز
Succinyl-Co A	سكسينيك كوأ
Succinyl thiokinase	سكسينيك ثيوكينيز
Sucrose	سكروز
Sugar	سكر
Sulfhydryl groups	مجاميع السلفاهيدريل
Sulfite waste liquor	محلول (ماء) كبريتيتي متخلف
Sulfer dioxide	ثاني اوكسيد الكبريت
Surface tension	توتر سطحي
Survival of microbes	بقاء الميكروبات
Symbiosis	تعايش ، تكافل
Synergism	تآزر ، تعاون
Synthesis	تخليق
Synthetic media	بيئة تخليقية (تركيبية)

T

Temperature	درجة الحرارة
Template	قالب ، طبقة
Terramycin	تيراميسين
Test organism	كائن الأختبار
Tefracyclines	تتراسيكلين
Thallophyta	ثالوسيات
Thermal Death Point (TDP)	درجة الموت الحراري
Thermal Death Time (TDT)	زمن الموت الحراري
Thermodynamics	ديناميكاحرارية

Thermophiles	محبة للحرارة العالية
Thiamin	ثيامين
Thin-layer chromatography (TLC)	التحليل الكروماتوجرافي بالطبقة الرقيقة
Thin-layer gel	هلام الطبقة الرقيقة
Thiol esters	استرات الثيول
Thymine	ثايمين
Top fermenting yeast	خميرة التخمر السطحي
Total capacity	سعة كلية
Toxins	سموم (توكسينات)
Trace elements	عناصر نادرة (ضئيلة)
Transamination	نقل مجاميع الامن (عبور اميني)
Transcription	نسخ
Transduction	التحول المنقول
Transfer	نقل ، تحويل
Transferase	ترانسفريز
Transformation	تحول
Translation	ترجمة
Transmitted light	ضوء نافذ
Transmittance	نفاذية
Transport	نقل
Tricarboxylic acid cycle (TCA)	دورة حامض ثلاثي الكربوكسيل
Trichome	ترايكوم (على هيئة شعرية)
Trickling filter	مرشح بطيء التقطر
Trophophase	طور النمو
True bacteria	بكتريا حقيقية
True fungi	فطريات حقيقية
True yeasts	خمائر حقيقية
Trypsin	تربسين
Tryptophan	تربتوفان
Turbidimetric analysis	التحليل بقياس العكارة

Turbidity	عكارة
Turbulant flow	سريان مضطرب (دوّامي)
Turbulence	اضطراب (دوّامي)
Turgor pressure	ضغط انتفاخي
Typical fermentation	تخمر نموذجي
Typical media	بيئة نموذجية

U

Upiquinone	يوبيكينون
Ultraviolet light	اشعة فوق البنفسجية
Unicellular organisms	احياء احادية الخلية
Unisexual	احادي الجنس
Uracil	يوراسيل
Urea	يوريا
Uridine diphosphate (UDP)	يوريدين ثنائي الفوسفات
UDP-galactose	UDP ــ جالاكتوز
UDP-glucose	UDP ــ جلوكوز
Uridine triphosphate (UTP)	يوريدين ثلاثي الفوسفات
Utility	منفعة ، فائدة
Utilization	استفادة ، استغلال

V

Vaccins	لقاحات فاكسينات
Vacuole	فجوة
Valine	فالين
Variants	ضروب

Z

Zinc	زنك ، خارصين
Zone	بقعة ، منطقة
Zone of inhibition	منطقة التثبيط
Zoospores	سبورات سابحة
Zygospores	سبورات لاقحية
Zygot	لاقحة

INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

VOLUME 1

FUNDAMENTALS OF INDUSTRIAL FERMENTATIONS

BY

DR. ADIL GEORGE SACHDE
(Assis. Prof.)
DR. ALA Y. MOHAMED ALI
(Lecturer)

DEPARTMENT OF FOOD AND DAIRY TECHNOLOGY
COLLEGE OF AGRICULTURE- UNIVERSITY OF BASRAH